

ウイルス性炎症性脱髄およびウイルス性心筋炎マウスモデルにおけるNKT細胞の臓器特異的な役割

著者	川合 英一郎
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9298号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00096907

ウイルス性炎症性脱髄および
ウイルス性心筋炎マウスモデルにおける
NKT 細胞の臓器特異的な役割

川合 英一郎

目次

I.	要約	1
II.	研究背景	4
II-1.	タイラーウイルス	4
II-2.	NKT 細胞	5
II-3.	心筋炎	8
III.	研究目的	10
IV.	研究方法	11
IV-1.	動物実験	11
IV-2.	神経病理	12
IV-3.	リアルタイム PCR	13
IV-4.	リンパ球増殖反応	14
IV-5.	抗 TMEV 抗体およびサイトカインの ELISA による計測	15
IV-6.	心臓病理組織	16
IV-7.	心臓超音波検査	17
V.	研究結果	18
V-1.	J α 18KO マウスは TMEV-IDD 抵抗性を維持した	18
V-2.	J α 18KO マウスでは急性期の細胞性免疫が抑制されている	19
V-3.	NKT 細胞は強神経毒性 GDVII ウイルス感染で症状を悪化させる	21

V-4.	TMEV に感染した J α 18KO マウスは心筋炎を発症する	22
V-5.	TMEV ウイルス性心筋炎では高エコー病変を認める	23
VI.	考察	25
VII.	結論	33
VIII.	文献	34
IX.	図	45
X.	表	52

I. 要約

NKT 細胞は NK 細胞と T 細胞の両方の特性を持つ細胞として発見されたが、現在では CD1d 拘束性のリンパ球サブセットと定義されている。NKT 細胞は特定の組み合わせを持つ T 細胞受容体 (invariant T cell receptor, invariant TCR) を有し糖脂質を抗原として認識する NKT 細胞を I 型 NKT 細胞、それ以外を II 型 NKT 細胞に分類されている。NKT 細胞は自然免疫 (innate immunity) と獲得免疫 (acquired immunity) を繋ぐ働きがあるとされているが、感染するウイルスの種類によって防御的に働く場合と症状を悪化させるように働く場合があるなど、NKT 細胞の詳細な働きについては明らかにはなっていない。本研究では、NKT 細胞を持たない $J\alpha 18$ ノックアウト ($J\alpha 18$ KO) マウスを用いて、タイラーウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV) 感染における NKT 細胞の役割を検討した。

TMEV は感受性のあるマウスに対して中枢神経の脱髄や心筋炎を引き起こすことが知られており、特に中枢神経感染による灰白脳炎の慢性期には脱髄

(TMEV-induced demyelinating disease, TMEV-IDD) を認めることがある。この TMEV-IDD は多発性硬化症に類似した病態であることから多発性硬化症のウイルス感染モデルとして広く研究に用いられてきた。

本研究では、まず、中枢神経における NKT 細胞の働きを検討した。過去の SJL/J マウスや BALB/c マウスでの研究から、本来 TMEV-IDD に抵抗性である C57BL/6

マウスに TMEV を頭蓋内投与して感染させた場合、NKT 細胞が欠損していれば TMEV-IDD が惹起されると考えていた。しかし本研究において行った弱神経毒性 TMEV DA ウイルスの頭蓋内投与では、NKT 細胞が欠損する J α 18KO マウスにおいても野生型 C57BL/6 マウスと同様に脱髄所見はなく TMEV-IDD に抵抗性を維持したままであった。

自然免疫における NKT 細胞の働きを強神経毒性 TMEV GDVII ウイルスを用いて実験した。NKT 細胞を有する野生型 C57BL/6 マウスは生存率、半数致死量 (50% Lethal dose, LD50) とともに低く感染に弱いことが示された。これは NKT 細胞が GDVII 感染時には症状を悪化させる働きをすることを示しており、過去の報告とは異なる結果であった。

また本研究の過程で TMEV に感染したマウスでは心筋炎が起こっていることが確認された。そこで本研究では経時的に心臓の超音波検査や病理組織検査を行い J α 18KO マウスが野生型 C57BL/6 マウスより広汎な T 細胞浸潤や線維化を起こす心筋炎をきたすことを示した。また、J α 18KO マウスでは心筋組織中により多くのウイルス RNA が存在し、抗ウイルス抗体価も高かった。これは C57BL/6 マウスにおいては NKT 細胞がウイルス感染に対して防御的に作用していることを示すと考えられた。

これらの結果を以前の報告と比較すると、同じ TMEV を用いて NKT 細胞の働きを検討した実験においても NKT 細胞の働きはマウス種や臓器によって異なってお

り、防御的に働くことも、症状を悪化させる方向に働くこともあることがわかった。

II. 研究背景

II-1. タイラーウイルス

タイラーウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV) はピコルナウイルス科カルジオウイルス属タイロウイルス種に属するエンベロープを持たない一本鎖 RNA ウィルスであり、1937 年にマックス・タイラー (Max Theiler) により初めて報告された¹⁾。カルジオウイルス属はヒトをはじめ脊椎動物を自然宿主としており、カルジオウイルス属のウィルスは心筋炎を誘発することが多いことが知られている。TMEV はマウスの消化管から分離されたことからマウスを自然宿主としていると考えられている²⁾。TMEV は主にマウスに脳脊髄炎や脱髄を引き起こすウィルスとして知られている (図 1)。TMEV は神経毒性の違いにより強神経毒性の GDVII ウィルス、FA ウィルスとそれ以外の弱神経毒性の Daniels (DA) ウィルス、BeAN ウィルスなどの大きく 2 つに分類される³⁾。強神経毒性の GDVII ウィルス感染では致死性の急性灰白脳炎をすべてのマウス種に対して引き起こし、感染したマウスは概ね 10 日以内に抗ウィルス T 細胞や抗体の反応が誘導される前に死に至る⁴⁾。GDVII、FA ウィルス以外のウィルスは弱神経毒性ウィルスであり、これらの弱神経毒性ウィルスは急性期の脳炎と慢性期の脱髄の 2 相性の症状を引き起こす⁵⁾。弱神経毒性 TMEV である DA ウィルスでは中枢神経に急性脳炎を起こすが死に至ることはなく、慢性期に SJL/J マウスなどの感受性のあるマウスに脱髄を起こす。DA ウィルスはマウス種に関わらず、すべてのマウスの中枢神経細胞に感染し、1 週間程度で感染細胞を死滅させて灰白脳炎を生じ

る。しかし、脱髄病変は感受性のあるマウスでのみ観察され、感染 1 ヶ月後の慢性期にも病変部にウイルスが存在し進行性の脱髄病変を生じる⁶⁾。他方、脱髄抵抗性の C57BL/6 マウスや BALB/c マウスでは慢性期には TMEV は排除され、慢性期の病変は発症しない^{7, 8)}。感受性のあるマウスにおける TMEV による脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease, TMEV-IDD) は多発性硬化症と臨床症状や病理組織が似ていることから広く多発性硬化症のマウスモデルとして使用されている^{9, 10)}。

神経組織以外では TMEV はウイルス血症を起こし心筋炎を起こすことが報告されている (図 1)。また、消化管や骨格筋に感染することが知られているが、中枢神経感染以外のことは十分には研究されていない^{11, 12)}。

II-2. NKT 細胞

NKT 細胞は全 T 細胞の 1% 以下を占める細胞で、マウスにおいては肝臓や骨髄に存在する T 細胞の中では約 30% と高い比率で存在するほか、脾臓の T 細胞の 0.5 から 1%、末梢リンパ節の T 細胞のうち 0.1 から 0.5% が NKT 細胞であるとされる^{13, 14)}。また中枢神経系¹⁵⁾や心臓^{16, 17)}にも存在することが示されているが全 T 細胞における比率はわずかである。NKT 細胞は当初は T 細胞受容体 (T-cell receptor, TCR) と NK 細胞特異的なマーカーである NK1.1 (CD161) の双方を有する NK 細胞の一群として報告された¹⁸⁾が、現在では CD1d からのみ抗原提示を受ける (CD1d 拘束性) リンパ球サブセットが NKT 細胞と定義される。CD1d 拘束性である NKT 細胞は I 型と II 型の 2 種類の

サブタイプに分類される。I型は古典的 NKT 細胞とされ、invariant NKT 細胞とも呼ばれており、特定の TCR (invariant TCR) を発現し、 α -GalCer などの糖脂質を抗原として認識する。TCR は α 鎖と β 鎖から成り、一般的には α 鎖を構成する $V\alpha$ と $J\alpha$ が多様な組み合わせを有しているが、I型NKT細胞が発現する TCR はマウスでは $V\alpha 14$ と $J\alpha 18$ 、ヒトでは $V\alpha 24$ と $J\alpha 18$ の組み合わせに限定され、多様性がないため invariant TCR と称される。また、 β 鎖についてもマウスでは $V\beta 8.2$ 、 $V\beta 7$ 、 $V\beta 2$ のいずれか、ヒトでは $V\beta 11$ とのみ組み合わせられて TCR を構成する^{19, 20)}。II型は CD1d 拘束性であるが TCR は多様であり親水性抗原を認識する²⁰⁻²²⁾。

一般的な T 細胞は抗原提示細胞からのシグナルである蛋白抗原を MHC class I (Major histocompatibility complex、主要組織適合遺伝子複合体) または class II を介して、様々な $V\alpha$ と $V\beta$ の組み合わせを持つ TCR で受容する。しかし、この特定の invariant TCR は他の一般的な TCR と異なり、主に抗原提示細胞から MHC class I と類似した構造を持つ CD1d 分子を介した糖脂質抗原のみをシグナルとして受容する²¹⁾。そのシグナルを受けて NKT 細胞は炎症を促進するインターフェロン γ (INF- γ) やインターロイキン 17 (IL-17) と いった炎症を促進するサイトカインと炎症を抑制するインターロイキン 4 (IL-4) やインターロイキン 10 (IL-10) などのサイトカインを産生する(図 2)。

NKT 細胞の実験では海綿から抽出したスフィンゴ糖脂質である α -Galactosylceramide (α -GalCer) が NKT 細胞に対する抗原として使用されている。生体内での抗原は、外因性抗原としては細菌表面の糖脂質が抗原提示され NKT 細胞が認識することが報告されて

いるが、十分には解明されていない。NKT細胞の研究において、NKT細胞の機能を調べる際にはNKT細胞を活性化するもしくは機能を抑制するといった方法で機能解析が行われている。NKT細胞の活性化は α -GalCerなどの特異的リガンドによる刺激²³⁾や invariant TCR をより多く発現する V α 14J α 18 トランスジェニックマウス²⁴⁾が用いられ、機能の抑制には invariant TCR を KO することで NKT 細胞を欠損させた J α 18KO マウスや NKT 細胞を欠失させる抗 V α 14TCR 抗体²⁵⁾や CD1d を KO することで NKT 細胞を欠失させた CD1dKO マウス^{26, 27)}が用いられてきた。

NKT 細胞は自然免疫 (innate immunity) と獲得免疫 (acquired immunity) を繋ぐ働きがあるとされており、NKT 細胞は IFN- γ などの炎症を促進するサイトカインと IL-4 などの炎症を抑制するサイトカインの双方を産生できる。しかし、この両面的な特徴により、NKT 細胞は種々のウイルス感染に対して防御的に働くことも症状を悪化させる方向に働くこともあることがわかっている²⁸⁾。以前の報告では TMEV-IDD に感受性のある SJL/J マウスおよび抵抗性の BALB/c マウスで NKT 細胞は防御的に働くとされている。TMEV 感染の慢性期において抗 V α 14TCR 抗体の投与により NKT 細胞が不活化した SJL/J マウスはコントロールマウスに比べより重症な脊髄脱髄病変を認めた²⁷⁾。また、野生型 BALB/c マウスは TMEV-IDD に対して抵抗性であるが、CD1d をノックアウトされ CD1d 拘束性である NKT 細胞の機能が欠損した状態の BALB/c マウスでは TMEV-IDD を発症した⁸⁾。このように NKT 細胞はウイルス感染に対して防御的に働くことがある反面、J α 18KO マウスにデングウイルスを感染させた報告²⁹⁾や CD1dKO マウスにセンダイウイルスを感染させた報告

³⁰⁾では、症状を悪化させることがある。

II-3. 心筋炎

心筋炎は心筋細胞の炎症性疾患であり、感染、自己免疫性、薬剤性、放射線性など原因は多岐にわたるが多くの症例でウイルス感染によって引き起こされている(38-80%)と考えられている³¹⁻³⁴⁾。疫学的には心筋炎は若年者の突然死の主要な原因と考えられており、突然死の最大約 20%に達する³⁵⁻³⁷⁾。突然死などの重症患者が発生する一方で、心筋炎患者の一部においては臨床症状を呈さないことがあり、非侵襲的な心筋炎の標準的診断法や基準がないことから、臨床的には心筋炎の罹患率ははっきりしていない^{38, 39)}。ヒトでウイルス性心筋炎を起こすウイルスとしてアデノウイルス、コクサッキーB3 ウイルス(CVB3)、パルボウイルスB19、C型肝炎ウイルスなどが知られている^{40, 41)}。ウイルス性心筋炎の詳細な病理メカニズムはわかっていないが、ウイルス性心筋炎は3期の病期に分類できると提唱されている⁴²⁻⁴⁴⁾。第1期では心筋細胞内でウイルスの活発な増殖が起こっていると考えられ、劇症型的心筋炎はこの時期に相当すると考えられる⁴⁵⁾。第2期では第1期のウイルス増殖に引き続き免疫細胞の活動による炎症で心筋が障害されていると考えられる⁴⁶⁾。第1期と2期において激しいウイルス増殖と炎症反応が起こると第3期の慢性期においてはウイルスの存在の有無にかかわらず心筋の線維化とリモデリングが起こり一部症例においては拡張型心筋症に移行すると考えられている⁴¹⁾。免疫不全モデルのマウスを使った実験から TMEV が心筋炎を引き起こすという報告^{12, 47)}はされているが、詳細な病理メカニズ

ムは未だに不明である。

III. 研究目的

本研究では NKT 細胞の TMEV-IDD における役割を解明するため、TMEV-IDD に抵抗性の C57BL/6 マウスをバックグラウンドに持つ J α 18KO マウスを使用した。以前の報告では NKT 細胞は特異的抗体による抑制や抗原提示細胞の NKT 細胞特異的な分子を KO することで実験が行われていた。本研究においては NKT 細胞に特異的な TCR を KO した TMEV-IDD 抵抗性のマウスを使用することで、異なった実験系においても NKT 細胞が以前の報告と同様に働くかどうかを明らかにすることを目的とした。

その一方で他の臓器を調べていく過程で NKT 細胞が欠如した J α 18KO マウスの心臓においては野生型 C57BL/6 マウスに比べて TMEV ウイルス性心筋炎の炎症がより強く認められ、TMEV ウイルス性心筋炎において NKT 細胞が何らかの役割を果たしているものと考えられた。心筋炎の程度による臨床症状の差は認めなかったが、軽症心筋炎マウスモデルとして心臓超音波検査、病理組織標本を用いて TMEV ウイルス性心筋炎の経過を経時的な変化と NKT 細胞の TMEV ウイルス性心筋炎における役割を研究した。

IV. 研究方法

IV-1. 動物実験

実験には生後4週から8週の野生型 C57BL/6 マウス (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) と C57BL/6 マウスをバックグラウンドとする J α 18KO マウス⁴⁸⁾を使用した。マウスは specific pathogen-free (SPF) 環境のルイジアナ州立大学シュリーブポート校の動物施設で繁殖および飼育されたマウスである。

DA ウイルスを用いた神経系の実験では野生型 C57BL/6 マウス (n=27) と J α 18KO マウス (n=40) に 2×10^5 PFU (Plaque Forming Unit、プラーク形成単位) のウイルスを頭蓋内に感染させ脳炎を誘発した。GDVII ウイルスの実験では野生型 C57BL/6 マウス (n=32) と J α 18KO マウス (n=44) に 0.1 から 1000PFU を頭蓋内に投与し感染させた⁸⁾。感染させたマウスは1日1回の体重測定及び神経学的評価を行った。野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスの体重及び生存率の違いは DA ウイルスを感染させた実験ではスチューデント t 検定および χ^2 検定にて評価し、GDVII ウイルスを感染させた実験ではスチューデント t 検定および χ^2 検定、Log-rank 検定 (Kaplan-Meier 法) を用いて評価した。痙攣の程度については Racine スケールを用いて点数化した^{49, 50)}。口鼻部と顔面の異常運動を1点、頭部を前後に振る (nodding) 動きを2点、前肢のクローヌスを3点、後脚で立ち上がれば (rearing) 4点、後ろ脚で立ち上がったあとで倒れれば5点とした。神経学的所見として TMEV-IDD の臨床症状である痙性麻痺、動揺性歩行、righting reflex を観察した。

GDVII ウイルスを感染させた実験では生存率および半数致死量 (50% Lethal dose, LD50) を比較した。半数致死量は Reed and Muench の計算方法により求めた⁵¹⁾。

IV-2. 神経病理

マウスはリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) および 4% パラホルムアルデヒドで全身を還流して固定した。摘出した中枢神経組織はさらに 4% パラホルムアルデヒドに 3 日から 7 日間浸けて固定した。脊髄は 10 から 12 個に横断面で切断し、脳は冠状断面で 5 個に切断したのち、パラフィン固定した。HM325 ロータリーマイクロトームで 4 μ m 厚の切片を作製しミエリンに対してはルクソールファストブルー染色を行った。脊髄組織については脊髄の一横断面を前索、左右側索、後索の 4 つに分割した区域を 1 領域とし、切片中の全領域のうち脱髄 (demyelination)、髄膜炎 (meningitis)、血管周囲性単核細胞浸潤 (perivascular cuffing) を認めた領域の割合を各項目および全体 (overall pathology) についてパーセンテージで定量化した。脳の切片は髄膜炎 (meningitis) を 4 段階 (0 点: 炎症なし、1 点: 軽度な細胞浸潤、2 点: 中等度細胞浸潤、3 点: 高度細胞浸潤)、血管周囲性単核細胞浸潤 (perivascular cuffing) を 6 段階 (0 点: 炎症なし、1 点: 1 から 10 カ所、2 点: 11 から 20 カ所、3 点: 21 から 30 カ所、4 点: 31 から 40 カ所、5 点: 41 カ所以上)、脱髄 (demyelination) を 4 段階 (0 点: 脱髄なし、1 点: 軽度脱髄、2 点: 中等度脱髄、3 点: 高度脱髄) に分類し、各項目を合計した点数を最大 11 点となる brain pathology score として点数化した^{6, 8, 27)}。

IV-3. リアルタイム PCR

心臓および脳のウイルスを定量するためにリアルタイムPCRを施行した。感染4日後、7日後、1ヶ月後のマウスはPBSで還流された後、心臓を摘出し液体窒素で凍結した(感染4日後、1週間後、1ヶ月後の野生型C57BL/6マウスおよびJ α 18KOマウスのサンプル数はそれぞれn=9とn=11、n=4とn=9、n=3とn=8)。脳については感染7日後のものを心臓同様に摘出した(野生型C57BL/6マウス、J α 18KOマウスともn=5)。凍結した心臓および脳はTRI-reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) とともにホモジナイズしQiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いてRNAを抽出した。抽出したRNA 1 μ gをImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Corp., Madison, WI) を用いて逆転写しcDNAを作製した。50 μ gのcDNAを用いてRT2 Fast SYBR Green/Flourescein qPCR Master kit (Qiagen)とMyiQ™2 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) を使用してリアルタイムPCRを行い、RNAの定量化を行った。心臓および脳内のウイルスRNAに対するプライマーはTMEVのカプシド蛋白であるVP2に対するプライマーを使用した。心臓にはコントロールとしてはハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapd/Gapdh*) に対するプライマーを、また脳にはホスホグリセリン酸キナーゼ (phosphoglycerate kinase 1, *Pgk1*) に対するプライマーを使用した。VP2に対するプライマーシーケンスはフォワード (5'-TGGTCGACTCTGTGGTTACG-3') とリバース (5'-GCCGGTCTTGCAAAGATAGT-3') を使用した⁵²⁾。ウイルスRNA量はスチューデントt検定またはマン・ホイットニーU検定を用い

て統計的に検討した。

IV-4. リンパ球増殖反応

感染1週間後、1ヶ月後、2ヶ月後のマウスから脾臓を摘出し、2から5匹分の脾臓を1群として使用した。感染1週間後では野生型C57BL/6マウスを3群、J α 18KOマウスを4群使用し、感染1ヶ月後では野生型C57BL/6マウス8群、J α 18KOマウス6群を使用した。

脾臓は一群にまとめてすり潰したのちHistopaque[®]-1083 (Promega, Corp., Madison, WI) を用いて単核球 (mononuclear cells, MNCs) を分離した。MNCsは 2×10^5 個の細胞を96ウェルプレートでRPMI 1640培養液 (Mediatech, Inc., Manassas, VA) に10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS; Mediatech)、2 mM L-グルタミン (Mediatech)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich) と1% 抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB; Mediatech) を加えた培養液で5日間培養した。増殖を刺激する刺激物質としてMOI=5 (multiplicity of infection、感染多重度) のTMEV、 2×10^5 個のDAウイルスを感染させた抗原提示細胞 (DA-infected antigen presenting cells, DA-APCs) と 2×10^5 個の何も感染させていない状態のAPC (nAPCs)を用いた。DA-APCsは全脾臓細胞をin vitroでMOI=1のDAウイルスで24時間感染させて作製し、nAPCsは同様の手順でDAウイルスを感染させずに作製した。DA-APCsとnAPCsは¹³⁷Cs irradiator (J.L. Shepherd & Associates, San Fernando, CA)を用いて2000radsの放射線照射を行って抗原提示機能は維持しながら抗原提示細胞そのものの増殖は抑制した。リンパ球の増殖反応活性

の計測には1ウェルあたり1 μ Ciの $[^3\text{H}]$ チミジン (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA)を最後の24時間で加えてReeves Angel 934AH filters (Brandel, Gaithersburg, MD) とPHD™ Harvester (Brandel)を用いて採取した。取り込まれた放射能活性をWallac 1409 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer)で計測した。すべての培養は同じものを3つ組 (triplet)で行い平均を求め、結果はstimulation index (刺激した細胞のcpm (counts per minute、分時放射線計測回数)をコントロールのcpmで除した値)として表した⁵³⁾。

IV-5. 抗 TMEV 抗体およびサイトカインの ELISA による計測

TMEVに感染させた野生型C57BL/6マウスとJ α 18KOマウスの末梢血を感染1週間後、1ヶ月後にcheek-bleeding法で採血し抗TMEV抗体の血中濃度をELISAで測定した。96ウェルのNunc Immuno plate (Thermo Fisher Scientific)を10 μ g/mlのTMEV抗原で一晩コーティングした後、10% FBSに0.2%のTween®20 (Thermo Fisher Scientific) でブロックした。採取した末梢血の血漿を順次薄めたサンプルをウェルに加えて室温で90分間静置した。洗浄液にて洗浄後、peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (H+L) (Life Technologies, Gaithersburg, MD)をウェルに加え90分間精置した。免疫活性複合体はo-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich)を用いて検出した。検出にはMultiskan MCC/340 Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific)で波長492nmの吸光度を計測した⁵³⁾。頭蓋内投与実験では野生型C57BL/6マウス(n=7)とJ α 18KOマウス(n=6)を、腹腔内投与実験では野生型C57BL/6マウス(n=4)とJ α 18KOマウス(n=6)を用いた。

サイトカインアッセイでは感染1週間後、1ヶ月後のマウスから脾臓を摘出し、上記のリンパ球増殖反応と同様に2から5匹分の脾臓を1群として処理しMNCsを分離した。感染1週間後では野生型C57BL/6マウスを3群、J α 18KOマウスを5群使用し、感染1ヶ月後では野生型C57BL/6マウス4群、J α 18KOマウス6群を使用した。脾臓から分離したMNCsは6ウェルプレートに1ウェルあたり 8×10^6 個の細胞を加え、5 μ g/mlのconcanavalin Aで刺激し48時間培養した。培養液の上澄みを抽出し-80°Cで保存した。ELISAキット(BD Biosciences, San Diego, CA)の取扱説明書に従いIL-4、IL-10、IFN- γ の濃度について定量した⁵⁴⁾。

抗TMEV抗体測定およびサイトカインアッセイにおいて検定はスチューデントt検定を用いて行った。

IV-6. 心臓病理組織

心筋炎を誘発する実験においては 2×10^7 PFUのDAウイルスを野生型C57BL/6マウス(n=8)およびJ α 18KOマウス(n=16)の腹腔内に投与した。DAウイルスに感染したマウスから感染4日後、1週間後、4週間後に心臓の組織を摘出した。マウスをPBSに続いて4%パラホルムアルデヒドで灌流、固定したのち、心臓を摘出した。心臓は1mmの厚さで横断面でスライスしたものをマイクロトームで4 μ mの厚さで切ってパラフィン切片とした。切片はヘマトキシリンエオジン染色と線維化を観察するためにI型とIII型膠原線維を染色するピクロシリウスレッド染色を行った。線維化した領域はImage-Pro[®] Plus Version 6.3 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD)で面積を計測した。CD3陽性T細胞の浸潤を観察するために抗CD3抗体

(DAKO Corp., Carpinteria, CA)を用いてavidin–biotin–peroxidasecomplex (ABC) 法 (Vector, Burlingame, CA)で免疫染色した⁵⁵⁾。CD3陽性T細胞数は乳頭筋レベルの切片で顕微鏡下に数えた。

IV-7. 心臓超音波検査

上記の心臓病理組織を検討したすべてのTMEV感染マウスに対して、感染前、感染4日後、7日後、10日後、14日後、28日後に経胸壁心臓超音波検査を行った。超音波検査装置は小動物用超音波装置Vevo770および707Bトランスデューサー (Visual Sonics Inc., Toronto, Canada)を使用した。マウスはイソフルレンで麻酔した後、胸部の毛を剃り除毛剤で毛を除去した。マウスをテープで操作台に固定し心電図、心拍数、体温をモニターしながら心臓超音波検査を行った。左室短縮率 (Left ventricular fraction shortening, LVFS)、左室駆出率 (LV ejection fraction, LVEF)を左室短軸像で計測した⁵⁶⁾。大動脈、肺動脈、僧帽弁の各弁輪径、流出または流入波形を計測した。心室壁内の高エコー域の数、出現率を野生型C57BL/6マウスとJα18KOマウスで χ^2 検定を用いて比較した。

V. 研究結果

V-1. J α 18KO マウスは TMEV-IDD 抵抗性を維持した

DA ウイルスを頭蓋内投与し感染させるとウイルスは脳のニューロンのほとんどのに感染し、すべてのマウス種において感染後 1 週間の急性期に急性灰白脳炎を引き起こす^{57, 58)}。急性期の脳炎から回復したマウスのうち感受性のあるマウスのみが慢性期となる感染後 1 ヶ月頃に脊髄の脱髄をおこす。本実験において感染させた 17 匹の野生型 C57BL/6 マウスと 21 匹の J α 18KO マウスは両群とも TMEV-IDD の臨床症状を呈することはなかった。急性期には野生型 C57BL/6 マウスも J α 18KO マウスも脳炎を起こし、臨床症状としてけいれんが観察された。両群の間にけいれんの程度の差について Racine scale を用いて比較した。野生型 C57BL/6 マウスは 3 日から 9 日目にけいれんを起こし、J α 18KO マウスは 4 から 8 日目にけいれんが観察された。けいれんの発症率、Racine scale とも両群間で統計学的有意差を認めなかった (χ^2 検定、 $P>0.05$) (図 3)。両群のマウスともけいれん以外の臨床症状を呈することはなく、けいれん消失後の 2 ヶ月間の観察期間中は無症状であった。

脳炎、脱髄についても病理組織学的な検討を行った。感染 1 週間後の脳の病理組織では両群のマウスとも重症な髄膜炎と血管周囲の炎症である perivascular cuffing を伴った灰白脳炎を起こしていた (図 4A)。ほとんどの炎症性病変は灰白質で観察され、特に海馬に多く認められた。感染 1 週間後の炎症の程度を点数化した brain pathology score (平均 \pm 標準誤差) では野生型 C57BL/6 マウスが 7.3 ± 0.3 に対して J α 18KO マウスは 7.0 ± 0.5 であ

りスチューデント t 検定において $P=0.62$ と有意差を認めなかった。感染 1 ヶ月後と 2 ヶ月後では脳炎は鎮静化しており軽度の炎症反応が両群のマウスの一部に認められるのみであった。感染 1 週間後の脊髄の病理組織においては overall pathology、meningitis、perivascular cuffing について両群はほぼ同等のスコアで有意差は認めなかった(表 1)。

慢性期には DA ウイルスは感受性のある SJL/J マウスで脊髄に脱髄を引き起こすことが知られている⁸⁾。本実験においても J α 18KO マウスは TMEV-IDD に感受性を持つようになり、perivascular cuffing や脱髄といった所見が出ると期待したが、感染 2 ヶ月後の両群の脊髄では脱髄や perivascular cuffing などの神経病理学的所見は認めず(図 4B)、脊髄の pathology score は両群とも全マウスが 0 点であった。

V-2. J α 18KO マウスでは急性期の細胞性免疫が抑制されている

NKT 細胞は抗ウイルス免疫反応の誘導に関わるとされている²⁸⁾。TMEV DA ウイルスを頭蓋内投与した野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスをそれぞれ 5 匹ずつ用いて感染 1 週間後の脳内のウイルス量を定量し、両群の抗ウイルス作用の違いを比較した。脳内のウイルス量は J α 18KO マウスの方が野生型 C57BL/6 マウスより低い傾向があった(スチューデント t 検定、 $P=0.07$) (図 5A)。しかし、ウイルス量とけいれんの重症度及び発生頻度についての相関は認めなかった。ウイルス量が少ないという事は抗ウイルス作用が強いと考えられたため、TMEV に対する細胞性免疫であるリンパ球増殖反応試験を行った。しかし、感染 1 週間後では J α 18KO マウスは C57BL/6 マウスに対して有意に低い TMEV 対

するリンパ球増殖反応を示していた。尚、感染 1 ヶ月後では両群のリンパ球増殖反応に有意な差は認めなかった(図 5B)。

抗炎症作用を持つ IL-4、IL-10 の産生、炎症促進作用を持つ IFN- γ と IL-17 の産生についても感染 1 週間後及び 1 ヶ月後の J α 18KO マウスと C57BL/6 マウスで比較した。感染 1 週間後の J α 18KO マウスは C57BL/6 マウスに対して有意に低い IL-4 の産生(平均 \pm 標準誤差:野生型 C57BL/6 マウス 42.8 \pm 7.5pg/ml、J α 18KO マウス 11.9 \pm 7.3pg/ml、 $P<0.05$)を示していたが、感染後 1 ヶ月では両群とも IL-4 産生は低値であった(図 6A)。IL-10 についても感染 1 週間後では J α 18KO マウスは C57BL/6 マウスに対して有意に産生が少なかった(平均 \pm 標準誤差:野生型 C57BL/6 マウス 536.5 \pm 45.1pg/ml、J α 18KO マウス 272.2 \pm 70.1pg/ml、 $P<0.05$)が、感染 1 ヶ月後では J α 18KO マウスでの IL-10 産生が低い傾向であったが有意差は認めなかった(平均 \pm 標準誤差:野生型 C57BL/6 マウス 733.1 \pm 359.8pg/ml、J α 18KO マウス 118.7 \pm 17.3pg/ml、 $P=0.21$) (図 6B)。一方で炎症促進作用を持つ IFN- γ と IL-17 については両群の間に明らかな関係性は見いだせなかった(図 6C, D)。

TMEV DA ウイルスを頭蓋内投与した野生型 C57BL/6 マウスおよび J α 18KO マウスの感染 1 週間後および 1 ヶ月後の抗 TMEV 抗体を定量した。感染 1 週間後には J α 18KO マウスがより多く抗体を産生していたが(図 7A)、感染 1 ヶ月後には有意差は認めなかった(図 7B)

V-3. NKT 細胞は強神経毒性 GDVII ウイルス感染で症状を悪化させる

感染急性期での NKT 細胞の働きを検討するために神経毒性が強い GDVII ウイルスを野生型 C57BL/6 と J α 18KO マウスに感染させた。GDVII ウイルス感染では獲得免疫が活性化される前に死亡するため自然免疫の違いのみが結果に反映される。10 から 1000 PFU の GDVII ウイルスを感染させたマウスは感染 4 日から 5 日後にけいれん、体重減少、毛の逆立ち (ruffled fur)、背中の屈曲 (hunched back) といった症状を呈し始めた。GDVII ウイルスに感染し症状を呈したマウスのほとんどは感染急性期の 1 週間から 10 日後に脳炎で死亡した。10 PFU の GDVII ウイルスで感染させたマウス群では感染 8 日後、9 日後には J α 18KO マウス群の方が野生型 C57BL/6 マウスよりも有意に生存率が高かった (χ^2 検定、 $P<0.01$) が、Kaplan-Meier 法および log-rank 検定では有意差は認めなかった ($P=0.09$) (図 8A)。半数致死量 (LD50) を求める実験では野生型 C57BL/6 マウスの LD50 が 0.398PFU に対して J α 18KO マウスの LD50 は 1.58PFU であった (表 2 から Reed and Muench の計算方法により算出)。これはサンプルの半数の J α 18KO マウスが死亡するのに必要なウイルス量は野生型 C57BL/6 マウスのそれよりも多いという事であり、NKT 細胞を持つ野生型 C57BL/6 マウスの方が GDVII ウイルス感染に弱いことを示した。また、J α 18KO マウスでは脳の pathology score も低い傾向があったが $P=0.14$ と有意差は認めなかった (図 8B)。体重減少も野生型 C57BL/6 マウスより少なかったが感染 7 日後に $P=0.22$ 、8 日後でも $P=0.06$ と有意差は認めなかった (図 8C)。

V-4. TMEV に感染した J α 18KO マウスは心筋炎を発症する

脳炎及び脳炎後慢性期の脱髄の実験では心臓から灌流液を注入するが、その際に心臓に肉眼的な白色斑様の病変を認め、心筋炎を起こしていると考えられた。中枢神経系の実験ではウイルスの感染ルートは頭蓋内投与であったが、脳炎による全身状態への影響を避けるため、ウイルス投与方法を腹腔内投与に変更し心筋炎の発症を比較した。ウイルスの腹腔内投与ではより重症な心筋炎が引き起こされた一方で脳炎症状は認められなかった。腹腔内投与により DA ウイルスに感染させた野生型 C57BL/6 マウスおよび J α 18KO マウスの体重変化、活動性の低下や浮腫の有無を観察した。体重変化については両群の間に有意な違いは認めず(感染 28 日後におけるパーセント平均体重 \pm 標準偏差: J α 18KO マウス $107.3 \pm 1.6\%$ 、野生型 C57BL/6 マウス $108.6 \pm 1.6\%$ 、 $P=0.53$)、心不全を示唆する所見も両群とも認めなかった。病理解剖学的には J α 18KO マウスの心臓では肉眼的に白色の多発性巣状病変を認めたが野生型 C57BL/6 マウスでは肉眼的病変は認めなかった(図 9A)。切片組織を顕微鏡下に観察したところ、両群のマウスとも心臓に炎症細胞の浸潤を認めたが、J α 18KO マウスの方が野生型 C57BL/6 マウスよりも多くの炎症性細胞の浸潤を認めた(図 9B)。炎症性病変はいずれも径 1mm 未満で MNCs を中心とする細胞浸潤は局限していた。すべての炎症性病変が心筋組織内に認められており、心内膜、心外膜、腱索、弁などの組織中には認めなかった。T 細胞のマーカーである CD3 に対する抗体を用いた免疫染色(図 9B)と I 型および III 型膠原線維を染めるピクロシリスレッド染色を用いた切片(図 9C)では、心筋間質内への T 細胞の浸潤は感染後 1 週間

後にのみ認められ、感染 4 日後、1 ヶ月後には認めなかった。線維化は早いマウスでは感染後 1 週間後より認められ、時間経過とともに進行した。T 細胞の浸潤と線維化の程度を定量化すると感染 1 週間後には J α 18KO マウスでは野生型 C57BL/6 マウスよりも T 細胞の浸潤が多く、感染 1 週間後と 1 ヶ月後には J α 18KO マウスでより広汎な線維化を認めた。しかしながら、同群であっても細胞浸潤の程度や線維化の大きさはばらつきが大きく、統計学的な有意差は認められなかった。これは TMEV による心筋炎病変が散在性ではなく多発巣状であり病理切片によって含まれる病変の数や大きさが一定ではないためであったと考えられ、これは TMEV による心筋炎病理の特徴のひとつと考えられた。

V-5. TMEV ウイルス性心筋炎では高エコー病変を認める

本実験においては TMEV に感染させたマウスの左室心筋病変を心臓超音波検査で経時的に観察した。右心室壁についてはエコーウィンドウが十分に確保できず全体を観察できないマウスが多かったため本実験では評価対象とはしなかった。尚、この実験を行うにあたり、TMEV 感染前のすべてのマウスに高エコー病変がないことを確認し、TMEV に感染していないコントロール群のマウスでも病変の出現がないことを確認している。

心臓超音波検査では感染させたマウスの左心室壁および心室中隔に高エコーを示す病変 (high intensity lesion) を認めた (図 10A)。高エコー病変は出現が早いマウスでは感染 4 日後より認められた。1 ヶ月の観察期間中に病変の数は徐々に増加した。大きさはいずれも径 1mm 未満であった。感染 28 日後には J α 18KO マウスの 68.8% (16 匹中 11 匹)

に高エコー病変が認められたが、野生型 C57BL/6 マウスでは 12.5% (8 匹中 1 匹) にのみ認められた。病変発生率については J α 18KO マウスと野生型 C57BL/6 マウス間で統計学的有意差を認めた ($P<0.05$ 、図 10B)。左室短縮率 (Fraction shortening, FS) や左室駆出率 (Ejection fraction, EF)、僧帽弁流入波形などのパラメーターについても経時的に記録していたが、経時的变化も両群間での差も認めなかった。病理組織学的には高エコー病変は心筋の好塩基性変化 (basophilic degeneration)、石灰化 (calcification)、線維化 (fibrotic change) に相当すると考えられた (図 10C)。

感染 4 日後、1 週間後、1 ヶ月後の心筋組織中のウイルス量をリアルタイム PCR で定量し、野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスで比較、検討した。J α 18KO マウスの心筋中のウイルス量は野生型 C57BL/6 マウスに対して感染 4 日後に 2.6 倍 ($P<0.05$)、感染 1 週間後に 1.2 倍のウイルス RNA が検出された (図 11)。両群ともウイルス RNA 量は経時的に減少していき、感染 1 ヶ月後の検体からは検出できなかった。抗体などの液性免疫はウイルス除去だけでなくウイルス性心筋炎の病理にも影響を与えていると考えられるため、両群の血清中の抗 TMEV 抗体を定量した。J α 18KO マウスは野生型 C57BL/6 マウスに対して感染 1 週間後と 1 ヶ月後において有意に高い抗体価を示した ($P<0.05$ 、図 12)。心筋炎における心筋細胞障害の程度を定量化するために心筋トロポニン I を ELISA で定量した。しかし、感染後のいずれの観測点においても J α 18KO マウス群、野生型 C57BL/6 マウス群とも血清中に心筋トロポニン I は検出されなかった。

VI. 考察

以前の報告においては神経毒性の弱いDAウイルス感染でも、神経毒性の強いGDVIIウイルス感染でもNKT細胞は防御的に作用すると報告されている^{8, 27)}。DAウイルス感染についてはTMEV-IDD感受性のあるSJL/Jマウスに抗V α 14TCR抗体を投与しNKT細胞を不活化させたモデルにおいて慢性期の脊髄でより強いTMEV-IDDを認めた²⁷⁾。また、野生型はTMEV-IDD抵抗性であるBALB/cマウスをバックグラウンドとしたCD1dKOマウスでは野生型と異なり炎症性脱髄が認められている⁸⁾。これらの結果から、当初、本研究での実験ではJ α 18KOマウスはTMEV-IDDに感受性を持つようになり脱髄所見が出現すると予想していた。しかしながら、C57BL/6マウスをバックグラウンドとしたJ α 18KOマウスはDAウイルス感染において野生型C57BL/6マウスと同様にTMEV-IDD抵抗性を維持したままであった。

同じく過去のBALB/cマウスとCD1dKOマウスを用いた強神経毒性GDVIIウイルス感染の実験において、NKT細胞のないCD1dKOマウスのLD50は野生型BALB/cマウスより低値でありNKT細胞が防御的に働くことを示していた。しかし本研究での強神経毒性GDVIIウイルス感染の実験において、J α 18KOマウスではLD50も生存率も野生型C57BL/6マウスよりも高く、野生型C57BL/6マウスよりも抵抗性が高いことを示した。このようにC57BL/6マウスをバックグラウンドとしたマウスにおけるDAウイルス感染においてNKT細胞は防御的な役割をすることはなく、逆にGDVIIウイルス感染においては症状を悪化させる働きをしたと考えられた。GDVIIウイルス感染では激しいウイルス増殖と神経細

胞のアポトーシスのために獲得免疫が確立する前に急性灰白脳炎で致死的な状態となるため^{4, 55, 59)}、NKT細胞を欠失することでウイルス感染に対する自然免疫全体の働きが変化し、Ja18KOマウスの高い生存率へつながったと考えられる(表2)。NKT細胞の働きに注目した以前の2つの報告と比較すると、本研究を含めた3つの報告がそれぞれ異なる結果を示したことは大変に興味深い結果であった。

これらの結果が異なる理由として、まず、マウス種が異なることが上げられる⁶⁰⁾。これらのC57BL/6マウス、BALB/cマウス、SJL/JマウスはTMEV感染に対してそれぞれ異なる感受性を有し、異なる免疫機能を有していると考えられる。野生型のC57BL/6マウスとBALB/cマウスはTMEV-IDDに抵抗性であるが、SJL/JマウスはTMEV-IDDに感受性があることがわかっている。サイトカインに関してはC57BL/6マウスとSJL/JマウスはINF- γ などの1型ヘルパーT細胞性サイトカインをより多く産生し、BALB/cマウスではIL-4やIL-10などの2型ヘルパーT細胞性サイトカインをより多く産生する。また、C57BL/6マウスではNK細胞のマーカーであるNK1.1を多く発現するのに対してBALB/cマウスやSJL/JマウスではNK1.1はほとんどあるいは全く発現していない⁶¹⁻⁶³⁾。これらの免疫系の違いは多様な免疫関連疾患に影響を与えるため、本研究と過去の報告との違いを説明するひとつの要因と考えている(表3)。

そのほかの違いをもたらす要因としてNKT細胞のサブタイプの違いが考えられる。

CD1d拘束性NKT細胞はI型とII型の2種類のサブタイプに分類される。I型は古典的NKT細胞とされ、invariant NKT細胞とも呼ばれており、invariant TCRを発現し、 α -GalCer

などの糖脂質を抗原として認識する。II 型は CD1d 拘束性であるが TCR は多様であり親水性抗原を認識する²⁰⁻²²⁾。本研究で用いた J α 18KO マウスおよび以前の報告で用いられた抗 V α 14TCR 抗体を投与された SJL/J マウスはいずれも invariant TCR を欠損あるいは欠失した状態であり I 型 NKT 細胞のみがない状態であるのに対し、CD1dKO BALB/c マウスを用いた実験においては I 型および II 型の両方の NKT 細胞がない状態であった。J α 18KO マウスはいくつかの微生物感染症において CD1dKO マウスとは異なった感受性を示すことが知られている^{26, 64)}。これはウイルス感染を含む微生物感染に対して I 型と II 型のそれぞれの NKT 細胞が異なった反応を示すためと考えられる。I 型に対して II 型 NKT 細胞の比率は極めて少ないが⁶⁵⁾、II 型 NKT 細胞の存在の有無により TMEV-IDD に対する感受性が変化していると考えられる。

カルジオウイルスはマウスなどいくつかの動物で心筋炎を起こすことが知られている。TMEV はカルジオウイルス属に属し、マウス種によっては心筋炎を起こすことが知られているが¹²⁾、TMEV による心筋炎についてはいくつかの報告がある⁴⁷⁾のみで病理メカニズムは十分に解明されていない。本研究においては、野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスでは異なった TMEV の心筋炎に対する感受性を持っていることが確認された。心筋炎の急性期で第 1 期に相当する^{44, 66)}感染 4 日後の J α 18KO マウスの心臓からは野生型 C57BL/6 マウスの心臓よりも多くのウイルス RNA が検出されており J α 18KO マウスではウイルス増殖による心筋障害が強く、より重篤な心筋炎を引き起こしたと考えられる。第 2 期に相当する感染 1 週間後の亜急性期では野生型 C57BL/6 マウスより J α 18KO マウスの方が

さらに激しい炎症所見を認めた。このことから J α 18KO マウスにおける第 1 期のより激しいウイルス増殖による心筋障害がより多くの炎症性細胞を誘導し第 2 期の炎症につながっていることが示唆された。そして第 1 期と第 2 期のより激しい心筋炎は感染 1 ヶ月後の慢性期である第 3 期により広汎な線維化病変として観察された。一方で心筋での炎症があつたにも関わらず第 1 期、第 2 期ともマウスは浮腫や活動性の低下、心機能の低下など心筋炎による臨床症状を呈することは全くなかった。心筋炎を起こしているにも関わらず、無症状であつたという経過は、ヒトでも経験される突然死で発見される無症候性心筋炎と類似した経過と考えられる^{34, 67, 68)}。ただし、本実験中に突然死したマウスはなかった。

本実験モデルでは心筋炎第 1 期のウイルス量が第 2 期の強い炎症と関連していたが、他の実験モデルではウイルス増殖量と炎症の程度は逆相関していた^{55, 59)}。しかし、本実験モデルの結果は、コクサッキー B3 ウイルス (CVB3) による心筋炎モデルでのウイルス増殖量と心筋の炎症が関係するという報告と近い結果であつた^{38, 39, 69)}。他方、Liu らは心筋炎を起こさない CVB3 ウイルスバリエントの感染ではウイルス量はほぼ同じであるにも関わらず、野生型 C57BL/6 マウスはほとんど心筋の炎症を起こさないが、J α 18KO マウスでは重症心筋炎を起こすと報告している⁷⁰⁾。J α 18KO マウスが TMEV でも CVB3 による感染でもより強い心筋炎を起こすという点は共通しているが、TMEV 感染においてのみウイルス量が増加しているという点は興味深い。この 2 つのモデルの違いは NKT 細胞以外の制御性 T 細胞 (Treg) や $\gamma\delta$ T 細胞の働きの違いによると考えられる^{53, 70-72)}。

TMEV DA ウイルスの中枢神経感染の急性期において J α 18KO マウスは野生型

C57BL/6 マウスよりも低い TMEV 特異的リンパ球増殖反応(細胞性免疫)と中枢神経でのウイルス価を示した一方で多くの抗 TMEV 抗体産生を行っていた。しかし、感染 1 ヶ月後には抗 TMEV 抗体は有意差が消失しており、急性期のわずかな期間でのみ抗体産生量に差が認められたのみであり、全般的な炎症の程度としては大きな差はなかったと考えられる。DA ウイルスによる心臓への感染では、Jα18KO マウスでより高い心臓でのウイルス価を示し、より多くの抗 TMEV 抗体産生(液性免疫)が行われた。一般的には激しいウイルス増殖はより強い細胞性免疫の反応を誘導しウイルスを除去しようとする。つまり、Jα18KO マウスの中枢神経感染においてリンパ球増殖反応が低値であったと言うことはウイルス量が少なかったためと推測される。他方、心臓においてはウイルス量が多いために激しい細胞性免疫による炎症が誘導されたと推測され、それに続く活発な液性免疫反応による抗体価上昇が観察されたと考えられる。

心臓を含む一般的な臓器ではウイルス除去は主に T 細胞が担っており、ウイルスに対抗する T 細胞はウイルスが感染した細胞の表面に発現したウイルス抗原と主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の複合体を認識しウイルスを排除しようとするため、MHC は細胞性免疫の反応に不可欠である。CVB3 ウイルス性心筋炎では T 細胞を中心とした細胞性免疫がウイルス排除の役割を果たすとされているが⁴⁶⁾、TMEV が主に感染するニューロンでは MHC は全く発現していないか、ごくわずかに発現しているのみであり⁷³⁾細胞性免疫よりも液性免疫が強く働くと考えられる。例えば、T 細胞も B 細胞も欠損している重症免疫不全(Severe combined immunodeficiency, SCID)マウスでの Sindbis ウイルス感染において、ウ

ウイルス抵抗性 T 細胞を補充してもニューロンでのウイルス増殖に変化はないが、抗ウイルス抗体を SCID マウスに投与すると中枢神経系からはウイルスが排除される⁷⁴⁾。このことは抗ウイルス抗体が中和抗体として感染細胞から放出されたウイルスの活性を抑えることでウイルスの拡散を抑制する点、抗ウイルス抗体がニューロンに取り込まれ細胞内のウイルス排除を行う点の 2 点から説明できる⁷⁵⁾。ウイルスに対する免疫反応を持たない nude マウスの TMEV 感染においても抗ウイルス抗体を感染直後に投与すると生存率は有意に改善する⁷⁶⁾。これらのことから抗ウイルス抗体はニューロンに感染した TMEV の排除も助けることができると考えられる。しかし、抗 TMEV 抗体はホストとの交叉反応を示し中枢神経の免疫反応を活性化してしまう⁷⁷⁾。MHC の発現が少ない中枢神経組織においては NKT 細胞の活性化もそれ以外の臓器と異なる系で行われていると考えられている。現在、中枢神経において astrocyte の TLR3 を介して TMEV を認識し、INF- α/β を活性化する系が示されており^{78, 79)}、また、中枢神経中にも CD1d が発現しており sulfatide を抗原として II 型 NKT 細胞を活性化することが確認されている⁸⁰⁾が、I 型 NKT 細胞がどのような系で活性化されるのか機序は明らかではない。

本研究では感染 1 週間後では Ja18KO マウスで抗 TMEV 抗体が上昇していたものの、1 ヶ月後には有意差はなくなっていた。ウイルス量が少なく細胞性免疫反応も低い本研究における Ja18KO マウスの中枢神経感染モデルでは、細胞性免疫が誘導される以前に NKT 細胞がウイルスを排除するための何らかの役割を担っていると考えられ、液性免疫はウイルス排除にほとんど関与していないことが考えられた。また、抗 TMEV 抗体価の上昇

がないため慢性期の脱髄も誘発されなかったと考えられる。他方で心臓に対する感染における高い抗ウイルス抗体価は CVB3 ウイルス性心筋炎と同様に免疫病理の原因となっていると考えられる。

ヒトにおけるウイルス性心筋炎の第 2 期において、Th1 サイトカインである IFN- γ が免疫反応による心筋組織障害(免疫病理)に寄与していると報告されている⁸¹⁾。さらに、以前の報告においては C3H マウスを用いた TMEV ウイルス性心筋炎の実験において Th1 の免疫反応が心筋炎を増悪させる役割を担っていることがわかっている⁶⁶⁾。本研究でも TMEV ウイルス性脳脊髄炎の感染 1 週間後の第 2 期において J α 18KO マウスは野生型 C57BL/6 マウスの約 6 倍の Th1 の免疫反応を示していた(Th1 (INF- γ) / Th2 (IL-4) 比は J α 18KO マウスで 7.6、野生型 C57BL/6 マウスで 1.3 であった)。それに対して同じ感染 1 週間後において野生型 C57BL/6 マウスは J α 18KO マウスよりも Th2 サイトカインである IL-4 と IL-10 を有意に多く産生していた。炎症を促す Th1 サイトカインの産生は J α 18KO マウスが野生型 C57BL/6 マウスよりも多かったが、それに相関するように TMEV ウイルス性心筋炎モデルの心臓超音波検査における高エコー病変を持つマウスの比率も J α 18KO マウスの方が高かった。NKT 細胞は抗炎症作用を持つ Th2 サイトカインの主な産生細胞とされており¹⁸⁾、Th2 サイトカインは Th1 細胞の活性化を抑制し、抗原提示細胞の機能を制御することで Th1 細胞の分化も抑制している⁸²⁾。これらのことから、脳脊髄炎モデルと心筋炎モデルという違いはあるものの、脳脊髄炎モデルで観察された Th2 優位の免疫反応は心筋炎モデルに当てはめても矛盾のない結果であり、NKT 細胞は TMEV ウイルス性心筋炎において

は Th2 サイトカインの産生により Th1 と Th2 の作用のバランスを調整することで防御的な働きをしていると推察された。本研究により推測された TMEV ウイルス性心筋炎でのサイトカインの働きは、IFN- γ が防御的に働き、IL-4 が炎症を悪化させるという CVB3 などを用いた心筋炎モデルと異なり、より臨床的に経験される心筋炎に近いモデルであろう。ヒトのウイルス性心筋炎はこの TMEV ウイルス性心筋炎モデルにより、さらに多くのことがわかってくる可能性があると考えられる。

VII. 結論

NKT 細胞が欠損している J α 18KO マウスは TMEV DA ウイルス感染において野生型 C57BL/6 マウスと同様に TMEV-IDD には抵抗性を維持したままであり NKT 細胞は TMEV-IDD に影響を与えていなかった。しかし、TMEV GDVII ウイルス感染では NKT 細胞は症状を悪化させる方向に働いていることがわかった。これらは以前の報告とは異なる結果であった。

また本研究では TMEV により軽症心筋炎が誘発されることが明らかとなり、J α 18KO マウスは野生型 C57BL/6 マウスよりも重い心筋炎を起こしていた。TMEV ウイルス性心筋炎において J α 18KO マウスは野生型 C57BL/6 マウスに比べて第 1 期にはより高いウイルス価を示し、第 2 期ではより活発な炎症反応が見られ、第 3 期ではより広汎な線維化が出現した。心臓超音波検査では J α 18KO マウスに野生型 C57BL/6 マウスより多く高エコー病変が見られた。

NKT 細胞欠損あるいは NKT-KO マウスを用いることで NKT 細胞は各マウス種、各臓器においてそれぞれ異なった働きをしていることが示された。

VIII. 文献

1. Theiler M. : Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. J. Exp. Med. 1937; 65: 705–719.
2. Lipton HL. : Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. Infect. Immun. 1975; 11: 1147–1155.
3. Oleszak EL, Chang JR, Friedman H, *et al.* : Theiler's Virus Infection: a Model for Multiple Sclerosis. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17: 174–207.
4. Tsunoda I, Iwasaki Y, Terunuma H, *et al.* : A comparative study of acute and chronic diseases induced by two subgroups of Theiler's murine encephalomyelitis virus. Acta Neuropathol. 1996; 91: 595–602.
5. Jarousse N, Syan S, Martinat C, *et al.* : The neurovirulence of the DA and GDVII strains of Theiler's virus correlates with their ability To infect cultured neurons. J. Virol. 1998; 72: 7213–7320.
6. Sato F, Martinez NE, Shahid M, *et al.* : Resveratrol exacerbates both autoimmune and viral models of multiple sclerosis. Am. J. Pathol. 2013; 183: 1390–1396.
7. Inoue A, Koh C-S, Yahikozawa H, *et al.* : The level of tumor necrosis factor- α producing cells in the spinal cord correlates with the degree of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. Int. Immunol. 1996; 8: 1001–1008.

8. Tsunoda I, Tanaka T, Fujinami RS. : Regulatory Role of CD1d in Neurotropic Virus Infection. *J. Virol.* 2008; 82: 10279–10289.
9. Sato F, Omura S, Martinez NE, *et al.* : Animal Models of Multiple Sclerosis in Neuroinflammation. 1st ed.; 2011:55–79.
10. Martinez NE, Sato F, Omura S, *et al.* : Immunopathological patterns from EAE and Theiler's virus infection: Is multiple sclerosis a homogenous 1-stage or heterogenous 2-stage disease? *Pathophysiology* 2013; 20: 71–84.
11. Daniels JB, Pappenheimer AM, Richardson S. : Observations on encephalomyelitis of mice (DA strain). *J. Exp. Med.* 1952; 96: 517–530.
12. Gómez RM, Rinehart JE, Wollmann R, *et al.* : Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced cardiac and skeletal muscle disease. *J. Virol.* 1996; 70: 8926–8933.
13. Godfrey DI, Kronenberg M. : Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* 2004; 114: 1379–1388.
14. Eberl G, Lees R, Smiley ST, *et al.* : Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J. Immunol.* 1999; 162: 6410–6419.
15. Hao J, Liu R, Piao W, *et al.* : Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J. Exp. Med.* 2010; 207: 1907–1921.

16. Pratschke J, Stauch D, Kotsch K. : Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *Transpl. Int.* 2009; 22: 859–868.
17. Jiang X, Shimaoka T, Kojo S, *et al.* : Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J. Immunol.* 2005; 175: 2051–2055.
18. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, *et al.* : CD1d-restricted iNKT cells, the “Swiss-Army knife” of the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20: 358–368.
19. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. : The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 297–336.
20. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. : Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 197–206.
21. Berzofsky JA, Terabe M. : NKT Cells in Tumor Immunity: Opposing Subsets Define a New Immunoregulatory Axis. *J. Immunol.* 2008; 180: 3627–3635.
22. Adams EJ, Luoma AM. : The yin and yang of CD1d recognition. *Nat. Immunol.* 2012; 13: 814–815.
23. Wu CY, Feng Y, Qian GC, *et al.* : α -Galactosylceramide protects mice from lethal Coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 162: 178–187.
24. Bendelac A, Hunziker RD, Lantz O. : Increased interleukin 4 and immunoglobulin E

production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. J. Exp. Med. 1996; 184: 1285–1293.

25. Ito T, Ishibashi K, Imai K, *et al.* : Monoclonal antibody against murine T cell receptor V α 14 cross-reacts with human CD3 epsilon and detects disulfide-linked dimeric form. Int. Immunol. 1991; 3: 991–995.

26. Smiley ST. : Immunoglobulin E Production in the Absence of Interleukin-4-Secreting CD1-Dependent Cells. Science. 1997; 275: 977–979.

27. Tsunoda I, Tanaka T, Taniguchi M, *et al.* : Contrasting roles for V α 14 + natural killer T cells in a viral model for multiple sclerosis. J. Neurovirol. 2009; 15: 90–98.

28. Diana J, Lehuen A. : NKT cells: Friend or foe during viral infections? Eur. J. Immunol. 2009; 39: 3283–3291.

29. Renneson J, Guabiraba R, Maillet I, *et al.* : A Detrimental Role for Invariant Natural Killer T Cells in the Pathogenesis of Experimental Dengue Virus Infection. Am. J. Pathol. 2011; 179: 1872–1883.

30. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, *et al.* : Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. Nat. Med. 2008; 14: 633–640.

31. Archard LC, Richardson PJ, Olsen EG, *et al.* : The role of Coxsackie B viruses in the

pathogenesis of myocarditis, dilated cardiomyopathy and inflammatory muscle disease.

Biochem. Soc. Symp. 1987; 53: 51–62.

32. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, *et al.* : Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. J. Am. Coll. Cardiol. 2003; 42: 466–472.

33. Kuhl U. : High Prevalence of Viral Genomes and Multiple Viral Infections in the Myocardium of Adults With “Idiopathic” Left Ventricular Dysfunction. Circulation 2005; 111: 887–893.

34. Liu P, Baughman KL. : Myocarditis in Braunwald’s Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Ninth Edit. Elsevier; 2012:1595–1610.

35. Feldman AM, McNamara D. : Myocarditis. N. Engl. J. Med. 2000; 343: 1388–1398.

36. Doolan A, Langlois N, Semsarian C. : Causes of sudden cardiac death in young Australians. Med. J. Aust. 2004; 180: 110–112.

37. Fabre A. : Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. Heart 2005; 92: 316–320.

38. Yajima T. : Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection. Future Microbiol. 2011; 6: 551–566.

39. Fairweather D, Stafford KA, Sung YK. : Update on coxsackievirus B3 myocarditis. Curr. Opin. Rheumatol. 2012; 24: 401–407.

40. Huber SA, Gauntt CJ, Sakkinen P. : Enteroviruses and myocarditis: viral pathogenesis through replication, cytokine induction, and immunopathogenicity. *Adv. Virus Res.* 1998; 51: 35–80.
41. Cooper LT. : The heat is off: immunosuppression for myocarditis revisited. *Eur. Heart J.* 2009; 30: 1936–1939.
42. Kawai C. : From Myocarditis to Cardiomyopathy: Mechanisms of Inflammation and Cell Death : Learning From the Past for the Future. *Circulation* 1999; 99: 1091–1100.
43. Liu PP, Mason JW. : Advances in the Understanding of Myocarditis. *Circulation* 2001; 104: 1076–1082.
44. Martinez NE, Sato F, Kawai E, *et al.* : Regulatory T cells and Th17 cells in viral infections: implications for multiple sclerosis and myocarditis. *Future Virol.* 2012; 7: 593–608.
45. Yajima T, Knowlton KU. : Viral Myocarditis: From the Perspective of the Virus. *Circulation* 2009; 119: 2615–2624.
46. Whitton JL, Feuer R. : Myocarditis, Microbes and Autoimmunity. *Autoimmunity* 2004; 37: 375–386.
47. Rames DS. : The etiopathogenesis of Theiler’s murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced cardiomyopathy, including characterization of new strains of TMEV. 1995.

48. Cui J. : Requirement for V14 NKT Cells in IL-12-Mediated Rejection of Tumors. Science. 1997; 278: 1623–1626.
49. Racine RJ. : Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1972; 32: 281–294.
50. Benkovic SA, O’Callaghan JP, Miller DB. : Sensitive indicators of injury reveal hippocampal damage in C57BL/6J mice treated with kainic acid in the absence of tonic-clonic seizures. Brain Res. 2004; 1024: 59–76.
51. Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. : LD50 in Virology: A Laboratory Manual. Academic Press, INC.; 1992:62–67.
52. Deb C, LaFrance-Corey RG, Zoecklein L, *et al.* : Demyelinated Axons and Motor Function Are Protected by Genetic Deletion of Perforin in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2009; 68: 1037–1048.
53. Martinez NE, Karlsson F, Sato F, *et al.* : Protective and Detrimental Roles for Regulatory T Cells in a Viral Model for Multiple Sclerosis. Brain Pathol. 2014; 24: 436–451.
54. Fernando V, Omura S, Sato F, *et al.* : Regulation of an Autoimmune Model for Multiple Sclerosis in Th2-Biased GATA3 Transgenic Mice. Int. J. Mol. Sci. 2014; 15: 1700–1718.
55. Tsunoda I, Tanaka T, Terry EJ, *et al.* : Contrasting Roles for Axonal Degeneration in an

Autoimmune versus Viral Model of Multiple Sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2007; 170: 214–226.

56. Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, *et al.* : Suppressor of Cytokine Signaling 1 DNA Administration Inhibits Inflammatory and Pathogenic Responses in Autoimmune Myocarditis. *J. Immunol.* 2012; 189: 2043–2053.

57. Sato F, Martinez NE, Omura S, *et al.* : Heterogeneity versus homogeneity of multiple sclerosis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2011; 7: 165–167.

58. Martinez NE, Sato F, Omura S, *et al.* : ROR γ t, but not T-bet, overexpression exacerbates an autoimmune model for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2014; 276: 142–149.

59. Tsunoda I, McCright IJ, Kuang LQ, *et al.* : Hydrocephalus in mice infected with a Theiler's murine encephalomyelitis virus variant. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997; 56: 1302–1313.

60. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, *et al.* : Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet. Pathol.* 2012; 49: 32–43.

61. Kaminsky SG, Nakamura I, Cudkowicz G. : Selective defect of natural killer and killer cell activity against lymphomas in SJL mice: low responsiveness to interferon inducers. *J. Immunol.* 1983; 130: 1980–1984.

62. Giorda R, Weisberg EP, Ip TK, *et al.* : Genomic structure and strain-specific expression of the natural killer cell receptor NKR-P1. *J. Immunol.* 1992; 149: 1957–1963.
63. Singh AK, Yang J-Q, Parekh V V, *et al.* : The natural killer T cell ligand α -galactosylceramide prevents or promotes pristane-induced lupus in mice. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 1143–1154.
64. Huber S, Sartini D, Exley M. : Role of CD1d in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *J. Immunol.* 2003; 170: 3147–3153.
65. Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, *et al.* : Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 1789–1799.
66. Omura S, Kawai E, Sato F, *et al.* : Bioinformatics Multivariate Analysis Determined a Set of Phase-Specific Biomarker Candidates in a Novel Mouse Model for Viral Myocarditis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2014; 7: 444–454.
67. Eckart RE, Scoville SL, Campbell CL, *et al.* : Sudden death in young adults: a 25-year review of autopsies in military recruits. *Ann. Intern. Med.* 2004; 141: 829–834.
68. Blauwet LA, Cooper LT. : Myocarditis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2010; 52: 274–288.
69. Wang X, Li M, Xie Y, *et al.* : The frequency of invariant natural killer T cells correlates with the severity of myocarditis. *Viral Immunol.* 2014; 27: 88–95.

70. Liu W, Moussawi M, Roberts B, *et al.* : Cross-Regulation of T Regulatory-Cell Response after Coxsackievirus B3 Infection by NKT and $\gamma\delta$ T Cells in the Mouse. *Am. J. Pathol.* 2013; 183: 441–449.
71. Howe CL, Adelson JD, Rodriguez M. : Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol. Dis.* 2007; 25: 354–359.
72. Olson CM, Bates TC, Izadi H, *et al.* : Local production of IFN-gamma by invariant NKT cells modulates acute Lyme carditis. *J. Immunol.* 2009; 182: 3728–3734.
73. Joly E, Mucke L, Oldstone MB. : Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 1991; 253: 1283–1285.
74. Levine B, Hardwick J, Trapp B, *et al.* : Antibody-mediated clearance of alphavirus infection from neurons. *Science.* 1991; 254: 856–860.
75. Greenlee JE, Clawson S a, Hill KE, *et al.* : Purkinje cell death after uptake of anti-Yo antibodies in cerebellar slice cultures. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2010; 69: 997–1007.
76. Fujinami RS, Rosenthal A, Lampert PW, *et al.* : Survival of athymic (nu/nu) mice after Theiler's murine encephalomyelitis virus infection by passive administration of neutralizing monoclonal antibody. *J. Virol.* 1989; 63: 2081–2087.
77. Yamada M. : Monoclonal antibody to Theiler's murine encephalomyelitis virus defines a determinant on myelin and oligodendrocytes, and augments demyelination in experimental

allergic encephalomyelitis. J. Exp. Med. 1990; 171: 1893–1907.

78. Savarin C, Bergmann CC. : Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved. Curr. Opin. Pharmacol. 2008; 8: 472–479.

79. Carpentier PA, Williams BR, Miller SD. : Distinct roles of protein kinase R and toll-like receptor 3 in the activation of astrocytes by viral stimuli. Glia 2007; 55: 239–252.

80. Jeon S-B, Yoon HJ, Park S-H, *et al.* : Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells. J. Immunol. 2008; 181: 8077–8087.

81. Yuan J, Yu M, Lin Q-W, *et al.* : Th17 Cells Contribute to Viral Replication in Coxsackievirus B3-Induced Acute Viral Myocarditis. J. Immunol. 2010; 185: 4004–4010.

82. O’Garra A. : Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity 1998; 8: 275–283.

IX. 図

図 1 実験的 TMEV 感染とその症状を示す。TMEV をマウス（本研究においては野生型 C57BL/6 マウスおよび J α 18KO マウス）の頭蓋内、腹腔内に投与して感染させる。頭蓋内投与では灰白脳炎とそれに引き続き脱髄を誘発した。腹腔内投与では心筋炎が誘発した。

図 2 抗原提示細胞からのシグナルは CD1d を介して NKT 細胞の invariant TCR (マウスでは V α 14 と V β 18 に限定した組み合わせを持つ T 細胞受容体) に伝達される。抗原提示細胞からのシグナルを受けて NKT 細胞は IFN- γ や IL-10、IL-4 といったサイトカインを産生する。

図 3 TMEV DA ウイルスを野生型 C57BL/6 マウス (WT) と J α 18KO マウス (NKT-KO) それぞれに頭蓋内に注射し感染させた。上図は感染後に脳炎で痙攣を起こしたマウスの比率を野生型 C57BL/6 マウス (白丸) と J α 18KO マウス (黒丸) で示したものである。双方とも感染 3 日後より 9 日後にかけて痙攣を起こしているが、 χ^2 検定では有意差を認めなかった。下図は痙攣を起こしたマウスの Racine スケールによるスコアの平均を示したものである。野生型 C57BL/6 マウス (黒丸) と J α 18KO マウス (白丸) の間に Student t 検定で有意差を認めなかった。

図4 (A) TMEV DA ウイルス感染 1 週間後の野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスの脳の病理組織標本（ルクソールファストブルー染色）である。野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスは視床下部に同程度の髄膜炎（矢印）、血管周囲炎（二重矢印）、ニューロンの欠失（矢頭）を認める。倍率 29 倍。(B) TMEV 感染の慢性期である感染 2 ヶ月後の脊髄の病理組織標本（ルクソールファストブルー染色）。野生型 C57BL/6 マウスも J α 18KO マウスも SJL/J マウスで見られる脱髄所見（矢頭）を認めない。倍率 19 倍。

図5 TMEV を頭蓋内投与した野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスにおける脳でのウイルス増殖および脾臓から抽出した免疫細胞の TMEV 特異的な免疫反応を示した。(A) ウイルスゲノムはリアルタイム PCR 法を用いてウイルスのカプシド蛋白のひとつである VP2 を測定することで定量した。コントロールとしてハウスキーピング遺伝子であるホスホグリセリン酸キナーゼ (*Pgk1*) 遺伝子を用いた。感染 1 週間後の脳内のウイルス RNA は野生型 C57BL/6 マウス (Wild-type, 白抜き) が J α 18KO マウス (J α 18KO、黒塗り) に比較して多く検出されたが統計学的有意差は認めなかった ($P=0.07$)。(B) 感染 1 週間後における J α 18KO マウスの TMEV に対するリンパ球増殖反応は野生型 C57BL/6 マウスに比べて有意に低かった ($P<0.05$)。リンパ球増殖反応は脾臓から抽出した単核細胞 (mononuclear cells, MNCs)

を MOI=5 (multiplicity of infection、感染多重度) の TMEV (Live virus)、DA ウィルスに感染させた抗原提示細胞 (DA-APCs) と何も感染させていない抗原提示細胞 (nAPCs) でそれぞれ刺激して [^3H]チミジンの取り込みを定量化することで計測した。結果は Stimulation index として刺激群での cpm (count per minute、分時放射線計測回数) をコントロール群の cpm で除した値で示した。結果は平均 \pm 標準誤差 である。

図 6 TMEV に感染した野生型 C57BL/6 マウス (Wild-type, 白抜き) と J α 18KO マウス (J α 18KO, 黒塗り) のサイトカイン産生を示した。脾臓から抽出された MNCs を concanavalin A で刺激して産生されたサイトカインを ELISA にて定量した。結果は 3 から 6 群のマウス群の平均 \pm 標準誤差である。(A) 感染 1 週間後の J α 18KO マウスは野生型 C57BL/6 マウスよりも IL-4 の産生は少なかった。感染 1 ヶ月後では両群とも測定限度 (点線) に近い低値であった。(B) IL-10 の産生は J 感染 1 週間後では有意に J α 18KO マウスが野生型 C57BL/6 マウスよりも少なかった ($P<0.05$)。1 ヶ月後にも J α 18KO マウスが野生型 C57BL/6 マウスよりも少ない傾向を認めたが有意差は認めなかった ($P=0.21$)。(C) IFN- γ の産生は野生型 C57BL/6 マウス、J α 18KO マウスの双方において高値であり、有意差は認めなかった。(D) IL-17 の産生については野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスの間に一定の傾向を認めなかった。

図 7 頭蓋内投与による TMEV 感染後の野生型 C57BL/6 マウス (WT、白丸) と J α 18KO マウス (J α 18KO、黒丸) の液性免疫反応を比較した。J α 18KO マウスの抗 TMEV IgG 抗体は感染 1 週間後 (A) において野生型 C57BL/6 マウスに比べて有意に高値であった ($P<0.05$ 、スチューデント t 検定) が、感染 1 ヶ月後 (B) には有意差は認めなかった。血清抗 TMEV 抗体は ELISA 法で定量した。結果は平均 \pm 標準誤差で示されている。

図 8 強神経毒性 TMEV GDVII ウイルス 10 PFU (plaque forming units、プラーク形成単位) を頭蓋内投与し感染させた野生型 C57BL/6 マウス (Wild-type) と J α 18KO マウス (J α 18KO) の Kaplan-Meier 曲線と脳病理組織のスコアおよび体重変化率を図示した。両群とも 8 から 11 匹のマウス群である。(A) J α 18KO マウス (実線) は野生型 C57BL/6 マウス (点線) に対して長く生きる傾向はあるが Log-rank 検定では有意差はなかった ($P=0.09$)。(B) J α 18KO マウス (黒塗り) は野生型 C57BL/6 マウス (白抜き) に対して低い brain pathology score を示す傾向があったが有意差は認めなかった ($P=0.14$)。(C) TMEV GDVII ウイルス感染後の体重変化を示す。J α 18KO マウスの方が体重変化が少ない傾向だが有意差は認めなかった (感染 8 日後において $P=0.06$)。

図 9 TMEV DA ウイルスを腹腔内投与で感染させた野生型 C57BL/6 マウス

(Wild-type) と J α 18KO マウス (J α 18KO) の心臓病理組織を示す。(A) 感染 1 ヶ月後の J α 18KO マウスでは肉眼的に散在する白色点状の病変 (矢印) を認めたが野生型 C57BL/6 マウスでは認めなかった。(B) ヘマトキシリンエオジン染色をした感染 1 ヶ月後の心臓病理組織において J α 18KO マウスの心臓は野生型 C57BL/6 マウスよりも多くの炎症性細胞の浸潤を認めた (矢頭)。抗 CD3 免疫染色では心臓組織への炎症性細胞浸潤は主に CD3⁺T 細胞 (矢印) によるものである。写真倍率は 58 倍、拡大写真は 101 倍。12 匹の野生型 C57BL/6 マウスと 17 匹の J α 18KO マウスのうち、代表的な標本を示す。(C) 感染 1 ヶ月後の J α 18KO マウスでは病理組織にピクロシリウスレッド染色で大きな線維性病変を認めた (矢頭) が野生型 C57BL/6 マウスでは見られなかった。倍率は 23 倍。8 匹の野生型 C57BL/6 マウスと 13 匹の J α 18KO マウスのうち、代表的な標本を示す。

図 10 TMEV を感染させたマウスの心臓超音波検査画像およびヘマトキシリンエオジン染色 (H & E)、ピクロシリウスレッド染色 (SR) による心臓病理所見を示す。(A) J α 18KO マウスの心臓超音波検査画像 (左) およびその模式図 (中央) を示した。画像は心臓短軸像乳頭筋 (PM) レベルである。TMEV 感染した野生型 C57BL/6 マウスと J α 18KO マウスの一部は心室中隔 (IVS) や左室壁 (LVW) に高エコー病変 (矢印、矢頭) を認めた。(B) グラフは高エコー病変の発生率を野生

型 C57BL/6 マウス (Wild-type) と J α 18KO マウス (J α 18KO) で比較したものである。

感染 28 日後において、高エコー病変は J α 18KO マウスにおいて有意に多く認められた ($P<0.01$, χ^2 検定)。(C) 同一の J α 18KO マウスで得られた心臓超音波検査画像 (左端) とヘマトキシリンエオジン染色による病理組織標本 (中央左、合成像) の比較において、心臓超音波検査における高エコー病変 (黄矢印) はヘマトキシリンエオジン染色での病変 (四角内) と一致していた。中央右の画像は病変部の拡大 (倍率 56 倍) である。線維化、石灰化、好塩基性変性 (basophilic degeneration) を有する病変を認めた (矢頭)。また、右端のピクロシリウスレッド染色では同部位の線維化を認めている (矢頭)。

図 11 TMEV に感染させた野生型 C57BL/6 マウス (Wild-type, 白抜き) と J α 18KO マウス (J α 18KO, 黒塗り) の心臓でのウイルス増殖をリアルタイム PCR で定量した。感染 4 日後のウイルス RNA 量は野生型 C57BL/6 マウスより J α 18KO マウスが有意に多かった ($P<0.05$, マン・ホイットニー U 検定)。ウイルスゲノムは TMEV のウイルス構造蛋白である VP2 に対するプライマーを用いて定量し、コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である *Gapd* を定量した。ひとつのマウスグループは 3 匹から 10 匹のマウスより構成された。N.D.は検出できなかったことを示す。

図 12 腹腔内投与による TMEV 感染後の野生型 C57BL/6 マウス (Wild-type) と J α 18KO マウスの液性免疫反応を比較した。J α 18KO マウス (J α 18KO, 黒丸) の抗 TMEV IgG 抗体は感染 1 週間後 (A) および 1 ヶ月後 (B) において野生型 C57BL/6 マウス (白丸) に比べて有意に高値であった ($P<0.05$ 、スチューデント t 検定)。血清抗 TMEV 抗体は ELISA 法で定量した。結果は平均 \pm 標準誤差で示されており、ひとつのマウスグループは 6 から 7 匹のマウスで構成されている。

X. 表

表 1 TMEV DA ウイルスを頭蓋内感染させた 1 週間後の脊髄の pathology score¹

	野生型 C57BL/6 マウス	Jα18KO マウス	<i>t</i> 検定 (<i>P</i>)
Overall pathology ¹	15.0±5.4	13.9±3.2	0.80
Meningitis ¹	12.5±4.3	11.0±2.2	0.81
Perivascular cuffing ¹	2.5±1.1	2.9±1.0	0.81

¹ 平均スコア±標準誤差

表 2 GDVII ウイルス感染¹での野生型 C57BL/6 マウスと Jα18KO マウスの
死亡率および平均生存日数

PFU ²	野生型 C57BL/6 マウス		Jα18 KO マウス	
	死亡率 ³	平均生存日数 ⁴	死亡率	平均生存日数
1,000	6 / 6	5.4 ± 0.3	10 / 10	5.4 ± 0.4
100	4 / 4	6.0 ± 0.4	8 / 8	6.0 ± 0.5
10	11 / 11	6.8 ± 0.4	8 / 8	7.9 ± 0.5
1	5 / 6	8.0 ± 1.0	5 / 8	8.7 ± 0.3
0.1	0 / 5	N/A ⁵	0 / 10	N/A

¹ TMEV GDVII ウイルスを頭蓋内投与で感染させた

² 投与されたウイルスの PFU (Plaque forming units、プラーク形成単位)

³ 死亡したマウス数 / 感染させたマウス数

⁴ 感染後の平均生存日数 ± 標準誤差

⁵ N/A、該当無し

表 3 TMEV 感染した 3 つのマウス種における NKT 細胞の異なる役割¹

方法	マウス種	MHC ²	脱髄	GDVII ウイルス脳炎	心筋炎	参考文献
Vα14 抗体 ³	SJL/J	H2 ^s	防御的	防御的	役割なし	Tsunoda ²⁷⁾
CD1dKO ⁴	BALB/c	H2 ^d	防御的	防御的	役割なし	Tsunoda ⁸⁾
Jα18 KO ⁵	C57BL/6	H2 ^b	役割なし	悪化させる	防御的	本研究

¹ マウスは TMEV DA ウイルスまたは GDVII ウイルスに感染させた

² 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のハプロタイプ

³ 抗 Vα14 抗体を投与し Vα14 を発現する NKT 細胞を欠失させた

⁴ CD1d 拘束性 NKT 細胞が欠損した KO マウス

⁵ Vα14Jα18 を発現する NKT 細胞が欠損した KO マウス

図1

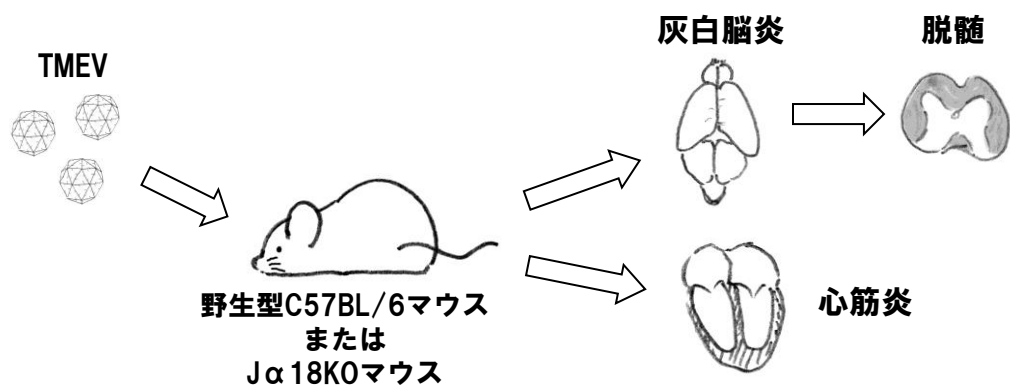


圖2

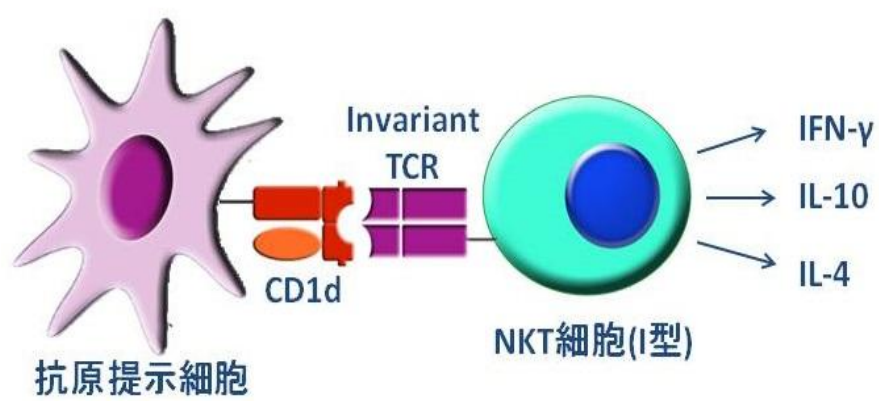
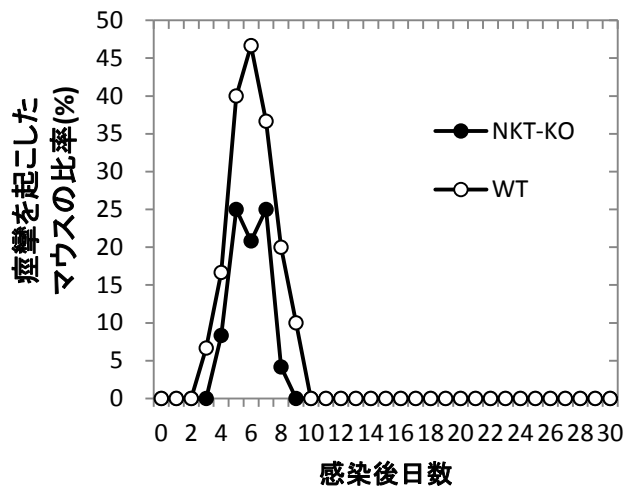


図3

痙攣を起こした マウスの比率(%)



痙攣を起こしたマウスの 平均スコア (Racine scale)

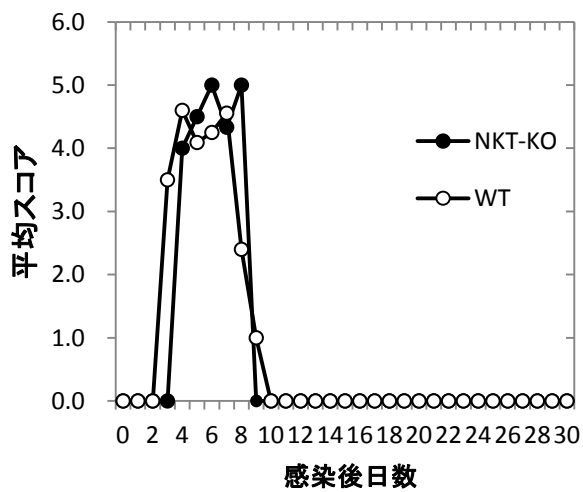


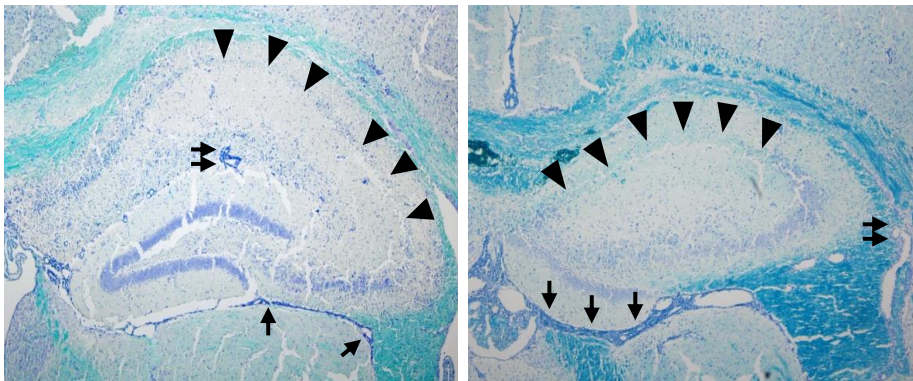
図4

A

野生型C57BL/6マウス

Ja18 KOマウス

脳組織(感染1週間後)



B

野生型C57BL/6マウス

Ja18 KOマウス

SJL/Jマウス

脊髄組織(感染2ヶ月後)

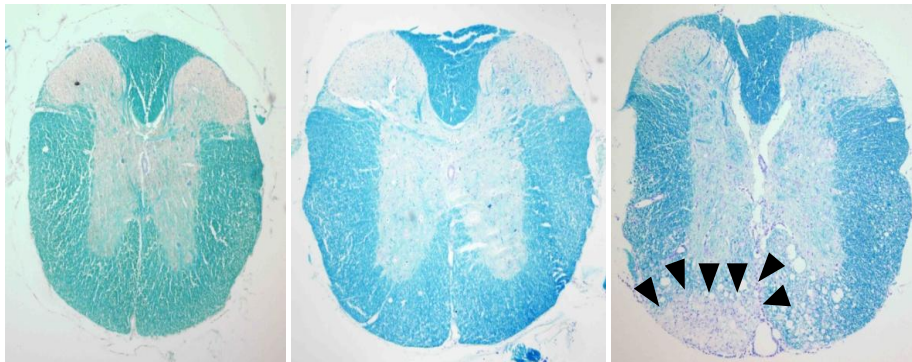
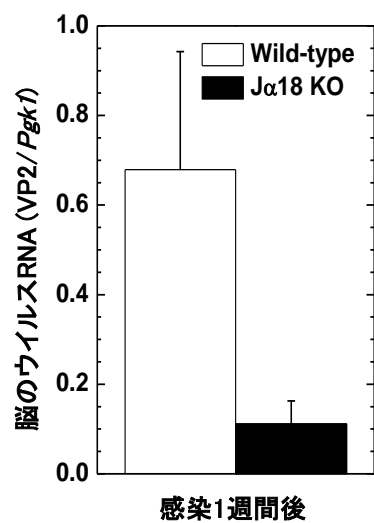


図5

A



B

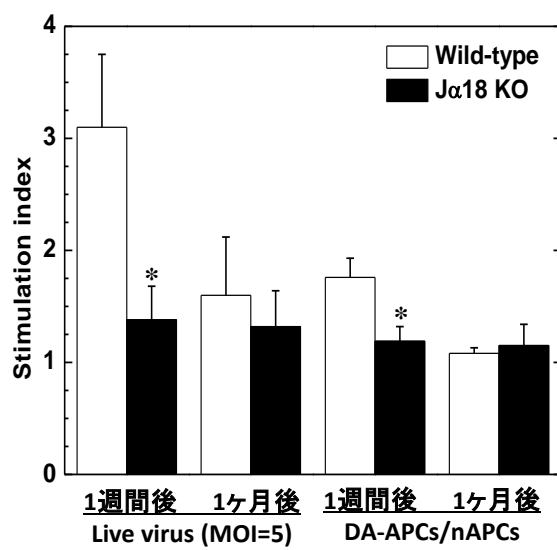


図6

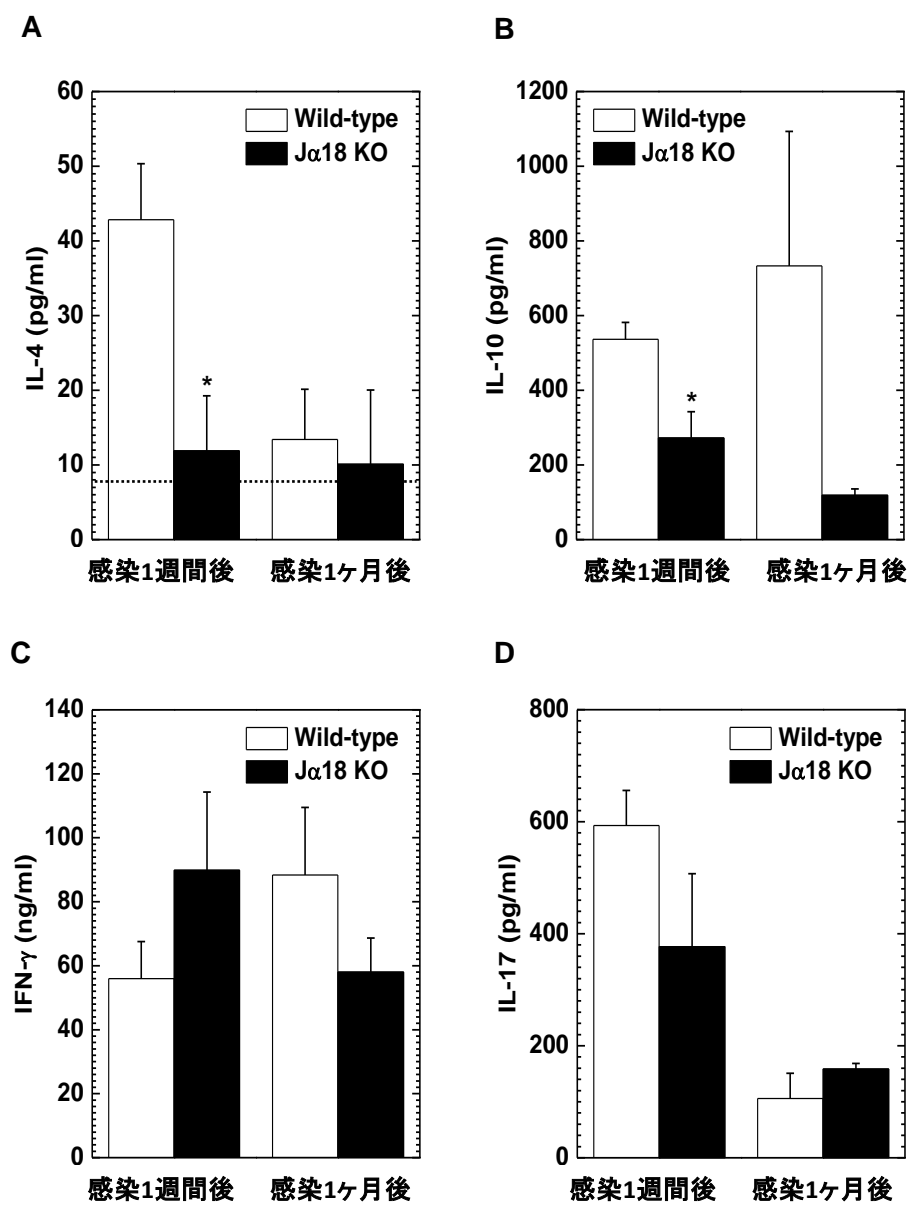
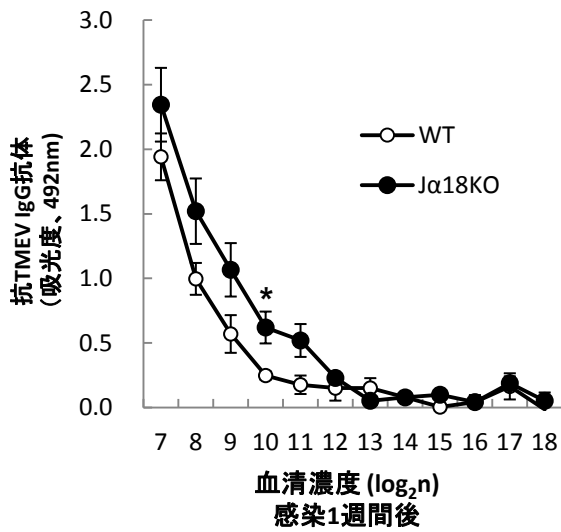


図7

A



B

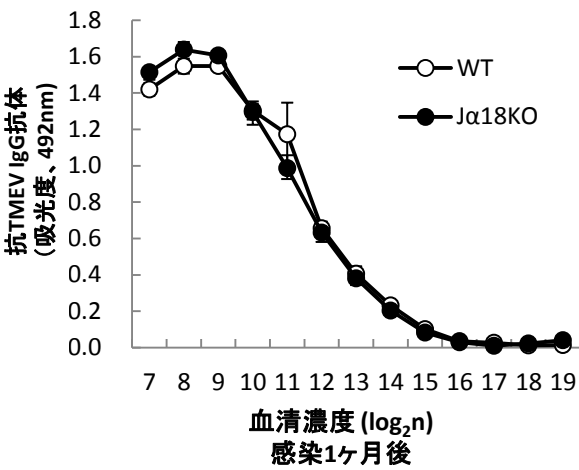


図8

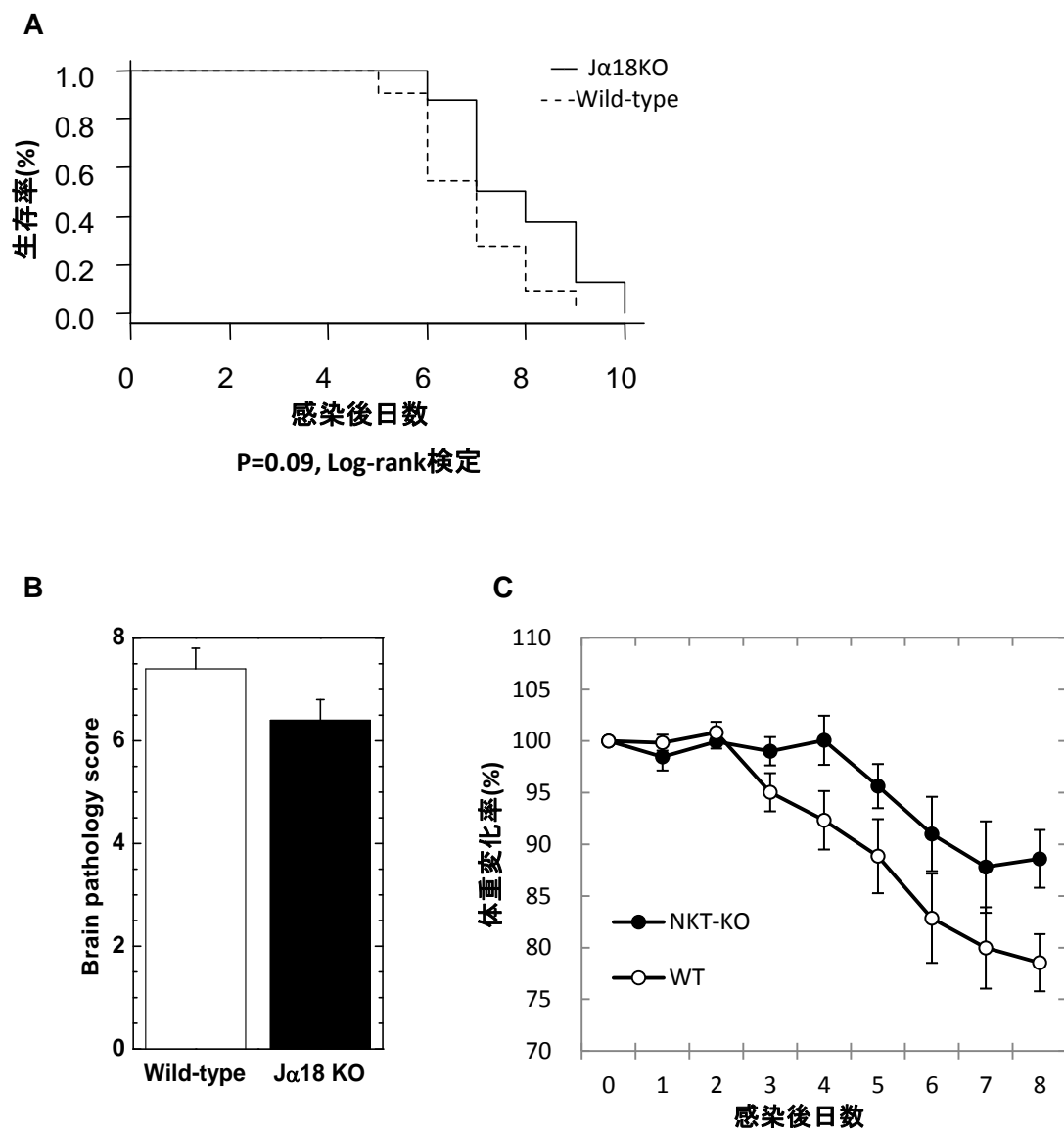


图9

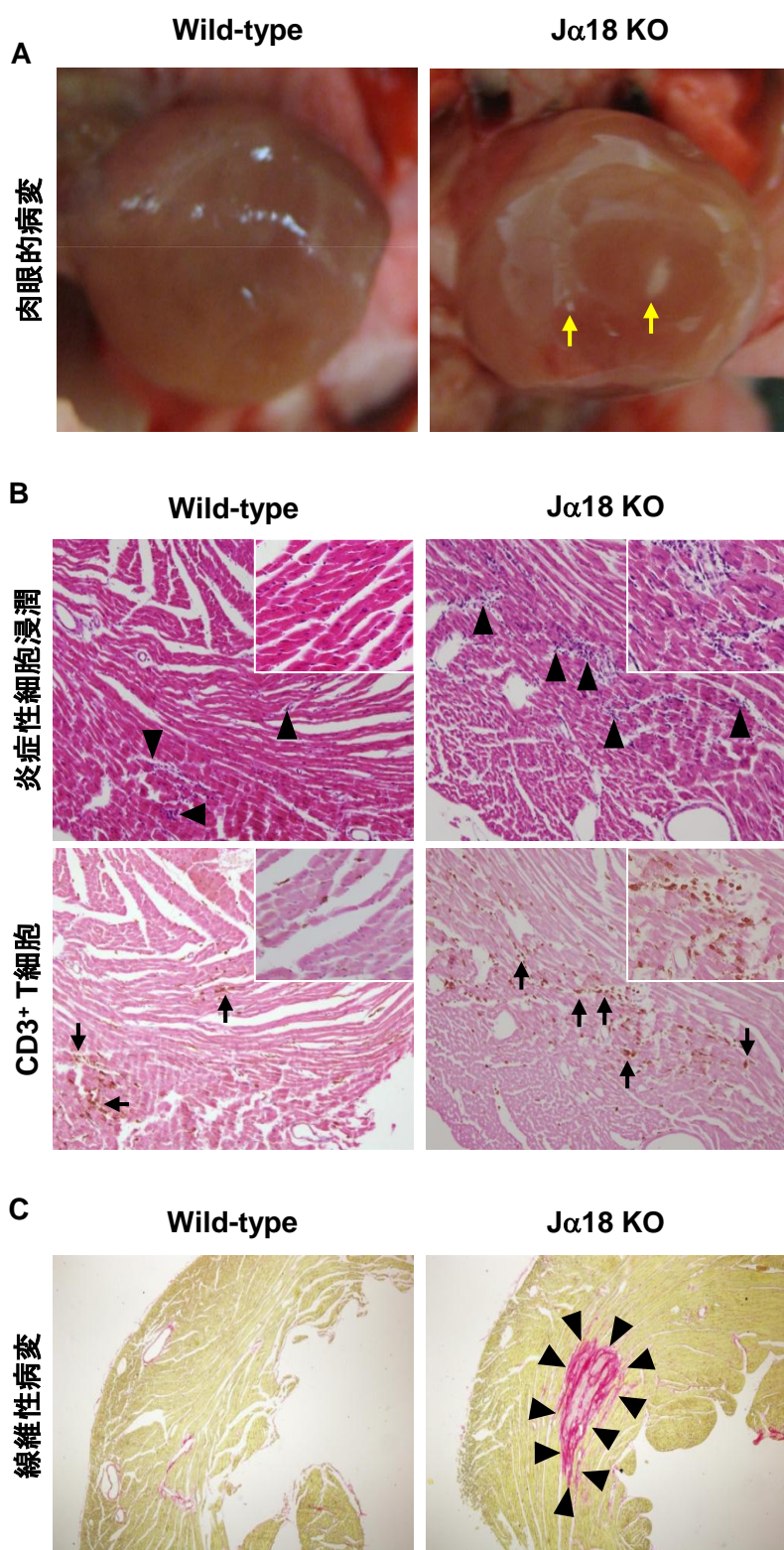
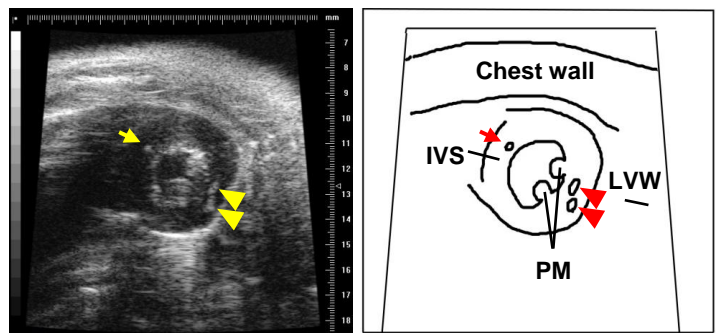
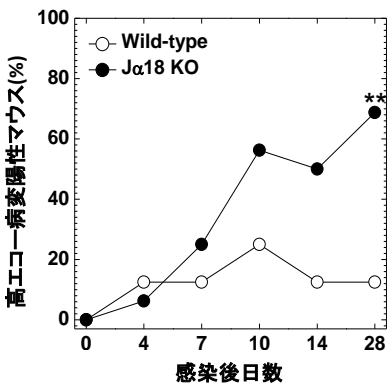


図10

A



B



C

心臓超音波検査所見

H & E

H & E

SR

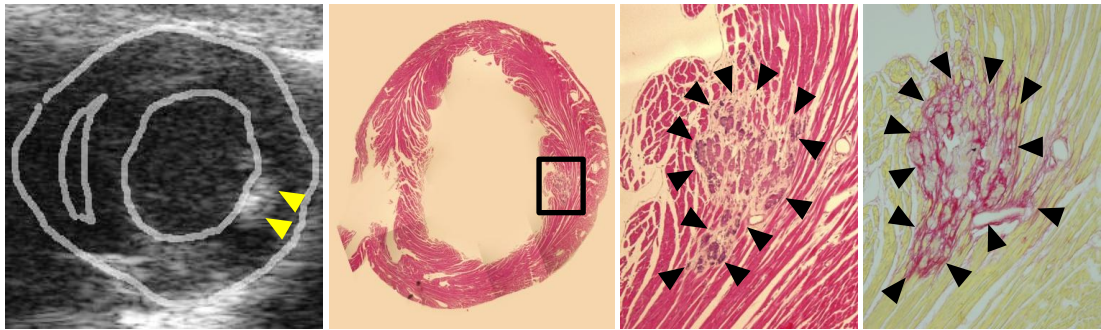


図11

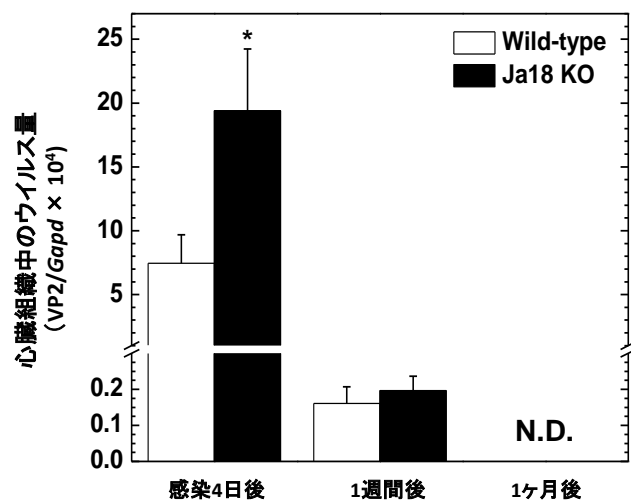
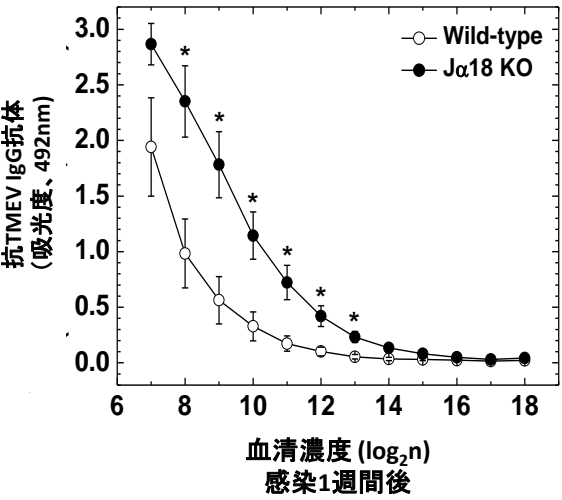


図12

A



B

